

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

**REGULACIÓN DE LA VÍA NRF2/HO-1 POR RECEPTORES
ACOPLADOS A PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS Y
EFECTO FARMACOLÓGICO DEL ÁCIDO
NORDIHIDROGUAYARÉTICO. RELEVANCIA EN
NEUROPROTECCIÓN FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO.**

Sandra Espada Serrano
Madrid, 2010

**Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**

**REGULACIÓN DE LA VÍA NRF2/HO-1 POR RECEPTORES
ACOPLADOS A PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS Y
EFECTO FARMACOLÓGICO DEL ÁCIDO
NORDIHIDROGUAYARÉTICO. RELEVANCIA EN
NEUROPROTECCIÓN FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO.**

**Sandra Espada Serrano
Licenciada en Biología y Bioquímica**

**Director de Tesis:
Dr. Antonio Cuadrado Pastor**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid
Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Autónoma de Madrid**

Antonio Cuadrado Pastor, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA: que Dña. Sandra Espada Serrano, Licenciada en Biología y Bioquímica por la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

Regulación de la vía Nrf2/HO-1 por receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas y efecto farmacológico del ácido nordihidroguayarático. Relevancia en neuroprotección frente a estrés oxidativo.

y que éste reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente y la originalidad y calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado.

Madrid, 1 de Septiembre de 2010.

Dr. Antonio Cuadrado Pastor

Agradecimientos

Quiero empezar dándole las gracias al Dr. Antonio Cuadrado por haberme permitido formar parte de este grupo y por haberme concedido esta beca FPI, que tanto he disfrutado. Gracias por haberme hecho aprender a pensar, a luchar y a llevar la iniciativa. En segundo lugar quiero agradecer a la Dra. Ana Isabel Rojo, por haberme enseñado tantas técnicas experimentales y por toda la paciencia y dulzura con la que siempre nos trata. Gracias también a toda la gente que ha pasado por el laboratorio durante estos cuatro años: a los que empezamos juntos: María, Esther, Ángel, Nadia, Patricia, y a los que vinieron después: Paz, Verónica, Isabel Mayo, Isabel Lastres, Rosa, Rosana, Nuria, Agnieszka, Marlen y mi “alumna” Zaira.

Quiero agradecer también a la Dra. Rosa Sagarra por habernos cedido el laboratorio C-11, donde he podido crecer y desarrollarme como investigadora, por todo el apoyo que siempre nos ha dado y por llenar el laboratorio de alegría.

Al grupo del Dr. José Pedraza-Chaverri, en especial a Eduardo, alias Lalo, por toda su ayuda desinteresada, no sólo a nivel profesional sino también a nivel personal. Muchas gracias por tu amistad. Sin olvidarme del resto de compañeros: Omar, Enrique, Mariel, Laura, Jazmín, Tino y Arely. A las Dras. Silvia Guzmán y Marisol Orozco, con las que tuve el placer de publicar un artículo. Y por supuesto al Dr. José Pedraza-Chaverri, por su enorme amabilidad y su continua disponibilidad para ayudarme y por haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio.

Al grupo de la Dra. María Teresa-Miras Portugal, en especial a Felipe, por su constante apoyo durante la tesis y por enseñarme tanto sobre los receptores purinérgicos, pero sobre todo por ser mi amigo, y por supuesto a las Dras. Raquel Pérez-Sen y María Teresa Miras-Portugal, por haberse portado siempre tan bien conmigo.

A Ana y Alba, del laboratorio C-20, y a Lola y Laura, del Departamento de Farmacología, por atenderme siempre con una gran sonrisa.

Quiero agradecer también a todas las personas que trabajan en el IIB y en la Facultad de Medicina de la UAM, que día a día nos hacen más fácil este trabajo: Servicio de Animalario (con mención especial para Iliana), Almacén, Cultivos celulares, Imagen, Lavado, Mantenimiento, Medios de cultivo, Microscopía, Soporte informático, etc.

No quiero olvidarme de agradecer a toda la gente de fuera del trabajo que ha hecho posible que estos últimos cuatro años hayan sido tan felices. A mis cuatro compañeras de piso: Verónica, Laura, Ana y Darya, por tantísimos momentos inolvidables dentro y fuera del piso. Nunca olvidaré los años que pasamos viviendo juntas. A todos mis amigos madrileños, en especial a Emilio y María Jesús, y también a los adoptados en Madrid: Ana, Cristina, Esther, Pablo, Rocío. Por supuesto sin olvidarme de los que no están en Madrid: Alicia, Angélica, David, Gracia, José, Kathleen, Marta, Susana, Txema... ni de mis amigos de Salamanca: Ainhoa, Ana, Bea, Carolina, Erica, Isabel, Nacho, Teresa, Vega, y el grupo del Dr. José Miguel López Novoa, donde empecé mi carrera investigadora. Gracias a todos por seguir ahí a lo largo de los años.

A mi querida hermana pequeña Ana Espada y a Santi. A mis padres, qué puedo decir, por todo su apoyo incondicional y por haber entendido siempre el camino que escogí en la vida.

A Jorge, por haber estado a mi lado durante estos tres últimos años, por ser una de las mejores personas que he conocido, y en definitiva, por quererme siempre tanto.

A Madrid, esa gran ciudad que me ha dado tanto... trabajo y felicidad. Gracias por toda la vida que irradias y que contagias, y que tanto echo de menos cuando no estoy aquí.

Por último, quiero agradecer a quien más calladamente ha intervenido en este trabajo: los animales de experimentación, sin cuya participación este trabajo no habría sido posible, y gracias a los cuales somos capaces de hacer que día a día la Ciencia avance un poquito más.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

La realización de esta Tesis Doctoral ha estado financiada por una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están estrechamente relacionadas con el origen y la progresión de varias enfermedades neurodegenerativas, por lo que es necesario encontrar nuevas dianas terapéuticas encaminadas a mantener el equilibrio redox celular. En esta Tesis Doctoral hemos estudiado la regulación de la principal vía antioxidante celular, la vía Nrf2/hemo oxigenasa-1 (HO-1), por dos receptores típicos del cerebro como son el muscarínico M1 y el purinérgico P2Y₁₃, así como la relevancia de este eje en la neuroprotección inducida por la activación de estos dos receptores y en respuesta al ácido nordihidroguayarático (NDGA).

El factor de transcripción Nrf2 es el controlador maestro de la homeostasis redox celular y regula la expresión de un conjunto de genes antioxidantes, citoprotectores y relacionados con biotransformación que reciben el nombre de genes de fase II. Bajo condiciones redox normales, Nrf2 se asocia a la proteína Keap1, que lo marca para degradación por la vía ubiquitina/proteasoma. Sin embargo, en presencia de moléculas electrofílicas o de un ambiente oxidante, Nrf2 escapa a la degradación proteolítica, se estabiliza, se transloca al núcleo y allí dimeriza con otras proteínas con cremallera de leucinas de la familia Maf para activar Elementos de Respuesta Antioxidante (AREs) localizados en los genes de fase II. Entre estos genes está el que codifica hemo oxigenasa-1 (HO-1), una enzima que cataliza la degradación del grupo hemo generando monóxido de carbono (CO), biliverdina y hierro libre. La biliverdina se convierte por acción de la biliverdina reductasa en bilirrubina, que es posiblemente el principal antioxidante no enzimático del organismo. En esta tesis hemos utilizado HO-1 como enzima modelo de fase II.

La activación del receptor muscarínico M1 por carbacol, en células PC12 y en neuronas granulares de cerebelo (NGCs), condujo a un incremento en los niveles de HO-1, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína. Además, también se incrementaron los niveles totales y nucleares de Nrf2. Mediante la utilización de inhibidores y de vectores de expresión para varias proteínas de señalización intracelular pudimos determinar que el receptor M1 utiliza Gαq, fosfolipasa C-β (PLC-β) y proteína quinasa C-γ (PKC-γ) como la vía de señalización principal que lleva hasta Nrf2. Alternativamente, la fosforilación e inhibición de GSK-3β por la PKC también activó a Nrf2. Por otra parte, la activación del receptor purinérgico P2Y₁₃ por su agonista 2-metil-tio-ADP (2MeSADP) también indujo el eje Nrf2/HO-1 en NGCs. En ambos casos, la inducción de este eje fue determinante para ejercer un efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo producido por peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Finalmente nos planteamos si la vía Nrf2/HO-1 podría ser diana farmacológica para una terapia de neuroprotección. Para este estudio hemos caracterizado el ácido nordihidroguayarático (NDGA), un polifenol con propiedades antioxidantes, que ha resultado ser un potente inductor de Nrf2. El NDGA activó la expresión de los AREs e indujo también la expresión de la enzima antioxidante HO-1.

Estos resultados sugieren nuevas formas de regulación de la vía antioxidante Nrf2/HO-1 en el cerebro, a través de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas como son el muscarínico M1 y purinérgico P2Y₁₃. Por otra parte, nuestro trabajo identifica un nuevo compuesto fenólico, el NDGA, como candidato farmacológico para inducir una respuesta neuroprotectora en el cerebro.

ABSTRACT

Production of reactive oxygen species (ROS) is tightly connected with the origin and progression of several neurodegenerative diseases. Therefore, it is necessary to find new therapeutic targets in order to maintain the cellular redox balance. In the present PhD Thesis, we have studied the regulation of the main cellular antioxidant pathway, Nrf2/heme oxygenase-1 (HO-1), by two prototypical receptors in the brain, muscarinic M1 and purinergic P2Y₁₃, as well as the relevance of this pathway in the receptor-mediated activation, and in response to nordihydroguayaretic acid (NDGA).

Key to control of redox homeostasis is Nrf2. It is a basic leucine-zipper transcription factor that, under normal redox conditions, associates with the protein Keap1, and this interaction promotes its degradation through the ubiquitine/proteasome system. In the presence of electrophilic compounds or oxidant conditions, Nrf2 dissociates from Keap1, stabilizes in the cytoplasm, enters the nucleus, dimerizes with other proteins from the Maf family and binds Antioxidant Response Elements (AREs) located at the promoters of antioxidant and drug-metabolizing genes, which code for different enzymes. Among these enzymes, heme oxygenase-1 (HO-1) is an important component of the cellular antioxidant and cytoprotective defense. HO-1 catalyzes the degradation of heme to generate carbon monoxide (CO), biliverdin and free iron. Biliverdin is converted by biliverdin reductase to bilirubin, probably the main non-enzymatic antioxidant in the organism. In the present PhD Thesis we have used HO-1 as a prototypical phase II enzyme.

The activation of muscarinic M1 receptor by carbachol, in PC12 cells and cerebellar granule neurons (CGNs), lead to an increase in HO-1 messenger RNA and protein levels. Carbachol also increased total and nuclear levels of Nrf2. Using inhibitors and specific expression vectors for different signalling proteins, we established Gα_q, phospholipase C-β (PLC-β) and protein kinase C-γ (PKC-γ) as the main pathway targeting Nrf2. Alternatively, the phosphorylation and inhibition of GSK-3β by PKC also activated Nrf2. The activation of purinergic P2Y₁₃ receptor by 2-methyl-thio-ADP (2MeSADP) also induced the Nrf2/HO-1 axis. In both cases, the induction of this antioxidant pathway was decisive to endorse a neuroprotective effect against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress.

Finally, we investigated if the Nrf2/HO-1 axis may be a pharmacological target for a neuroprotective therapy. In the present PhD Thesis we have characterized nordihydroguayaretic acid (NDGA), a polyphenolic compound with antioxidant properties. NDGA is a potent inducer of Nrf2, activates the expression of AREs and also up-regulates HO-1 expression.

These results show a previously unrecognized role of the muscarinic M1 and purinergic P2Y₁₃ receptors in the induction of the Nrf2/HO-1 antioxidant response and in protection against oxidative stress. On the other hand, our work identifies a new phenolic compound, NDGA, as a pharmacological candidate to induce a neuroprotective response in the brain.

INDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Estrés oxidativo y defensa antioxidante	4
1.1.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	4
1.1.2. Mecanismos de defensa antioxidante	5
1.1.3. El elemento de respuesta antioxidante ARE	7
1.1.4. El factor de transcripción Nrf2	8
1.1.5. La proteína represora Keap1	9
1.1.6. Otras formas de regulación de Nrf2	12
1.2. Hemo oxigenasa (HO)	14
1.2.1. Importancia fisiológica de la HO-1	15
1.2.2. Funciones citoprotectoras de los productos de la reacción catalizada por la HO-1	16
1.2.2.1. Monóxido de carbono (CO)	16
1.2.2.2. Bilirrubina y biliverdina	17
1.2.2.3. Hierro	19
1.3. Receptores acoplados a proteínas G	19
1.3.1. Receptores de acetilcolina	21
1.3.2. Receptores P2	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Cultivo celular	28
3.1.1. Animales	28
3.1.2. Cultivos primarios	29
3.1.3. Líneas celulares	30
3.2. Plásmidos	31
3.3. Producción de lentivirus	32
3.4. Ensayos de luciferasa	33
3.5. Detección de proteínas mediante <i>Immunoblot</i>	34
3.6. Fraccionamiento subcelular	35
3.7. Inmunofluorescencia	35
3.8. Ensayo de unión de [³ H]-escopolamina	38
3.9. Análisis de los niveles de ARN mensajero	38
3.9.1. <i>Northern Blot</i>	38

3.9.2. PCR semicuantitativa y a tiempo real	38
3.10. Determinación de la viabilidad celular	40
3.10.1. Ensayo colorimétrico con sal de tetrazolio (MTT)	40
3.10.2. Ensayo fluorescente de ioduro de propidio (IP)	41
3.10.3. Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)	41
3.11. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	42
3.12. Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH)	43
3.13. Análisis estadístico	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Regulación del eje Nrf2/HO-1 por el receptor muscarínico M1	45
4.1.1. Los agonistas colinérgicos inducen la expresión de HO-1 en cultivos primarios de neuronas que expresan el receptor muscarínico M1	45
4.1.2. Expresión ectópica del receptor M1 funcional en células PC12	46
4.1.3. La activación del receptor M1 induce la expresión de HO-1	46
4.1.4. La inducción de HO-1 por el receptor M1 es dependiente de la actividad transcripcional de Nrf2	48
4.1.5. El receptor muscarínico M1 utiliza Gαq para inducir los AREs	50
4.1.6. Gαq induce los AREs a través de la activación de la fosfolipasa C-β (PLC-β) y la proteína quinasa C-γ (PKC-γ)	51
4.1.7. La inhibición de GSK-3β a través del receptor M1 activa a Nrf2	53
4.1.8. La activación del eje Nrf2/HO-1 a través del receptor M1 protege de la muerte celular inducida por H ₂ O ₂	55
4.2. Regulación del eje Nrf2/HO-1 por el receptor purinérgico P2Y₁₃	57
4.2.1. El ADP y el 2MeSADP inducen la expresión de HO-1	57
4.2.2. El 2MeSADP utiliza el receptor purinérgico P2Y ₁₃ para inducir la expresión de HO-1 en NGCs	58
4.2.3. El 2MeSADP induce la activación del factor de transcripción Nrf2	60
4.2.4. El 2MeSADP protege a las NGCs frente a H ₂ O ₂	62
4.2.5. El 2MeSADP necesita a Nrf2 para proteger a las NGCs de la muerte inducida por H ₂ O ₂	63
4.2.6. El 2MeSADP necesita a la HO-1 y al receptor P2Y ₁₃ para atenuar el estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂	64
4.2.7. El 2MeSADP necesita a la HO-1 y al receptor P2Y ₁₃ para atenuar la muerte celular inducida por H ₂ O ₂	66

4.3. Regulación farmacológica del eje Nrf2/HO-1 por el NDGA	68
4.3.1. El NDGA induce la activación del factor de transcripción Nrf2	68
4.3.2. El NDGA induce la expresión de HO-1	69
4.3.3. La inducción de HO-1 por el NDGA es dependiente de la actividad transcripcional de Nrf2	70
4.3.4. El NDGA protege a las NGCs de la neurotoxicidad inducida por 3-NP y H ₂ O ₂	70
5. DISCUSIÓN	73
5.1. Señalización mediada por el receptor muscarínico M1	74
5.2. Señalización mediada por el receptor purinérgico P2Y ₁₃	78
5.3. Activación farmacológica del eje Nrf2/HO-1 por el NDGA	81
6. CONCLUSIONES	85
7. BIBLIOGRAFÍA	87
8. ANEXOS	109

ABREVIATURAS

2-APB: 2-aminoetoxidifenil borato	JNK: Quinasa del extremo amino terminal de c-Jun (del inglés c- Jun N-terminal Kinase)
2MeSADP: 2-metil-tio-adenosín difosfato	Keap1: Proteína 1 asociada con la proteína reguladora Kelch de <i>Drosophila</i> (del inglés Kelch-like ECH-Associated Protein 1)
3-NP: Ácido 3-nitropropiónico	LDH: Lactato deshidrogenasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico	MAPK: Quinasa activada por mitógenos (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase)
ADP: Adenosín difosfato	MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón (del inglés Mouse Embryonic Fibroblasts)
Akt: También denominada proteína quinasa B (PKB). La nomenclatura se debe a que la quinasa fue aislada de un retrovirus transformante celular AKT8 (acute transforming retrovirus) procedente de un linfoma de células T de la cepa de ratones AKR	NDGA: Ácido nordihidroguayarático
API1: Proteína activadora 1	NF-E2: Factor nuclear eritroide-2
ARE: Elemento de respuesta antioxidante (del inglés Antioxidant Response Element)	NGCs: Neuronas granulares de cerebelo
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	Nrf2: Factor de transcripción 2 relacionado con el factor NF-E2 (del inglés NF-E2-Related Factor-2)
BR: Bilirrubina	p38: MAP quinasa p38
BV: Biliverdina	PC: Pilocarpina
BVR: Biliverdina reductasa	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)
Cch: Carbacol	PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa
CHX: Cicloheximida	PKC: Proteína quinasa C
CORM: Molécula liberadora de monóxido de carbono (del inglés CO-Releasing Molecule)	PLC-β: Fosfolipasa-Cβ
D.E.: Desviación estándar	PTX: Toxina pertussis
DCC: Diciclomina	ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés Reactive Oxygen Species)
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés Extracellular signal-Regulated Kinase)	SnMP: Mesoporfirina de estaño
GPCR: Receptor acoplado a proteína G (del inglés G Protein-Coupled Receptor)	SnPP: Protoporfirina de estaño
GSH: Glutación en su estado reducido	tBHQ: Tert-butil-hidroquinona
GSK-3β: Glucógeno sintasa quinasa-3β	
H₂DCFDA: Diacetato de carboxi- 2',7'-diclorodihidrofluoresceína	
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno	
HO-1: Hemo oxigenasa-1	
IP: Ioduro de propidio	

INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE.

Los seres vivos se encuentran expuestos a un gran número de agresiones originadas por toda clase de estímulos, como las infecciones microbianas y virales, los agentes xenobióticos, las toxinas provenientes de la dieta y la hipoxia, la mayoría de las cuales inducen la formación de moléculas oxidantes y electrófilas que tienen la capacidad de dañar a las biomoléculas del organismo. Por tanto, la capacidad de adaptación al estrés generado por el medio ambiente es un requisito indispensable para la viabilidad celular y la supervivencia de los organismos.

1.1.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS).

El oxígeno, aunque es indispensable para la vida de los organismos aerobios, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones llega a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la aparición de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones no apareados. Las principales ROS son: a) las que se producen por la ruptura o excitación del oxígeno molecular (oxígeno atómico, ozono y oxígeno singlete) y b) las parcialmente reducidas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) (Hansberg, 2002).

Las especies parcialmente reducidas de oxígeno se producen por la adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno en un proceso que se conoce como reducción univalente (Fig 1). Para su total reducción a agua, el oxígeno es capaz de aceptar uno a uno, hasta cuatro electrones.

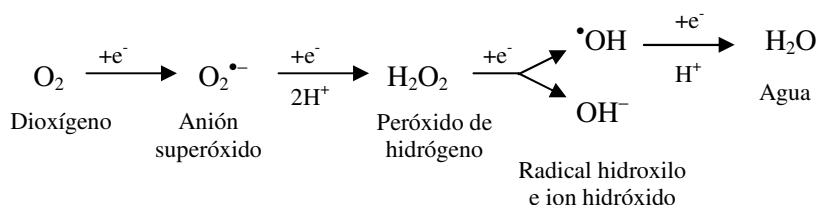


Figura 1. Reducción univalente del oxígeno.

Las ROS producidas por la reducción univalente del oxígeno son las siguientes:

- *Anión superóxido.* Radical que se forma cuando el oxígeno acepta un electrón. Se genera principalmente en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. No difunde lejos de donde se produce. Tiene una función importante *in vivo*, ya que participa en la descarga respiratoria (aumento súbito en el consumo de oxígeno) de las células fagocíticas activadas por contacto con partículas extrañas en eventos inmunológicos. Dentro de las principales enzimas generadoras de este radical se encuentran la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa. Puede originar radical hidroxilo por medio de la reacción de Haber-Weiss (Fig 2).

- *Peróxido de hidrógeno*. Se forma cuando el oxígeno acepta dos electrones. Es producido por la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) sobre el anión superóxido. No es un radical libre, pero puede formarlos por interacción con metales en la reacción de Fenton (Fig 3). Puede además participar en la reacción de Haber-Weiss (Fig 2). Tiene una gran lipofilicidad que le permite atravesar las membranas celulares fácilmente, por lo que se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios.



Figura 2. Reacción de Haber-Weiss.

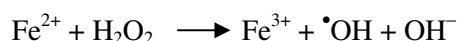


Figura 3. Reacción de Fenton.

- *Radical hidroxilo*. Radical que se forma cuando el oxígeno acepta tres electrones. Considerado como una de las especies más dañinas, tiene una vida media corta y reacciona fácilmente con las moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ADN, y cuando se genera cerca de las membranas biológicas puede reaccionar con los ácidos grasos y producir hidroperóxidos que se descomponen en una serie de compuestos tóxicos como aldehídos (Floriano-Sanchez *et al.*, 2006). La formación del radical hidroxilo se puede lograr fácilmente por la reacción de Haber-Weiss (Fig 2), que ocurre entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno y se incrementa en presencia de un metal de transición (Gutteridge *et al.*, 1992).

Cuando el balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes se pierde debido a un incremento en la producción de ROS, a una disminución en los sistemas antioxidantes, o a una combinación de ambos factores, se produce el denominado *estrés oxidativo*. El estrés oxidativo se ha asociado a la patogénesis de numerosas enfermedades neurodegenerativas, tales como Parkinson, Alzheimer, Huntington o esclerosis lateral amiotrófica (Mariani *et al.*, 2005). El Sistema Nervioso es particularmente sensible al estrés oxidativo, ya que posee un alto contenido en hierro (metal que participa en la generación de radicales libres), contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados que son susceptibles a la peroxidación lipídica, consume grandes cantidades de oxígeno para la producción de energía, y además tiene menores defensas antioxidantes en comparación con otros órganos (Adibhatla *et al.*, 2008). De todas las células del cerebro, las neuronas son particularmente sensibles al estrés oxidativo (Dringen, 2000).

1.1.2. Mecanismos de defensa antioxidante.

Las células, incluyendo las de origen nervioso, han desarrollado programas dinámicos para luchar contra el estrés oxidativo causado por las moléculas oxidantes y electrófilas. Recientemente se ha

observado que algunas enzimas antioxidantes forman parte de las reacciones de fase II utilizadas en biotransformación de agentes xenobióticos para su excreción:

- En la fase I, en la cual participan enzimas que metabolizan carcinógenos y xenobióticos (principalmente enzimas de la familia de los citocromos P450) se llevan a cabo reacciones de óxido-reducción que introducen o exponen grupos funcionales en dichas moléculas, para hacerlas un poco más polares (Kobayashi *et al.*, 2006b).
- Por otro lado, las reacciones de fase II son las que continúan con las acciones que ocurrieron durante la fase I, reducen la electrofilicidad de los metabolitos carcinógenos y xenobióticos modificados mediante su conjugación enzimática con ligandos endógenos, como pueden ser el glutatión (GSH) y el ácido glucurónico (Lee *et al.*, 2004), y convierten estas moléculas en polares para que puedan ser excretadas. El glutatión (GSH) es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina, y sirve como antioxidante al ser susceptible de reaccionar con radicales libres o ROS debido a su grupo sulfhidrilo. En las células y tejidos sanos, más del 90% de glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% existe en la forma disulfuro (GSSG). Un aumento de la proporción entre GSSG y GSH se considera un indicativo de estrés oxidativo.

Algunas de las enzimas que participan en la fase II ejercen una función antioxidante: NADPH:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), reduce a las quinonas con dos electrones promoviendo su detoxificación; UDP-glucuronosil transferasa, cataliza la conjugación del ácido glucurónico con xenobióticos y drogas para su excreción; superóxido dismutasa (SOD), dismuta el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 ; catalasa, descompone el H_2O_2 en oxígeno y agua; glutatión peroxidasa (GPx), cataliza la descomposición de H_2O_2 o de otros peróxidos orgánicos mediante la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG); glutatión reductasa (GR), que requiere NADPH para catalizar la conversión de GSSG a GSH; glutatión-S-transferasa (GST), cataliza la conjugación de GSH con un gran número de compuestos orgánicos; hemo oxigenasa-1 (HO-1), cataliza el primer paso (al mismo tiempo paso limitante) en el catabolismo del grupo hemo; etc. En total se han descrito más de 100 genes involucrados en la respuesta antioxidante. Entre los factores de transcripción que se activan por ROS destacan el factor nuclear κB (NF κ B), la proteína activadora 1 (AP1) y los factores relacionados con el factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) conocidos como Nrfs (del inglés: Nuclear Factor Erythroid 2-related factor).

Además, pequeñas moléculas antioxidantes también desempeñan un papel importante como antioxidantes celulares, es el caso de la vitamina C (ácido ascórbico), que *in vitro* reacciona directamente con $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ y varios peróxidos lipídicos, siendo la principal defensa antioxidante en plasma; la vitamina E (α -tocoferol), un antioxidante liposoluble que mantiene la integridad estructural de las membranas al actuar sobre radicales lipídicos como peroxilo e hidroperoxilo, y el ácido úrico, que aumenta la capacidad antioxidante del suero y previene la formación de productos de lipoperoxidación durante el ejercicio (Waring *et al.*, 2003). Del mismo modo, los polifenoles

antioxidantes colaboran en la prevención de los daños causados por las ROS eliminando radicales libres. En esta tesis nos hemos planteado estudiar un polifenol recientemente descubierto, el ácido nordihidroguayarático (NDGA), que se ha aislado de las hojas del chaparral (*Larrea tridentate*), un arbusto que crece en áreas desérticas del suroeste de Estados Unidos y del norte de México.

1.1.3. El Elemento de Respuesta Antioxidante ARE.

La inducción coordinada de los genes que codifican las enzimas de fase II protege a las células contra el daño generado por el estrés oxidativo. El análisis genómico de las secuencias de los promotores de genes de fase II ha revelado que coinciden en una secuencia específica de unión llamada Elemento de Respuesta Antioxidante, ARE (*Antioxidant Response Element*), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes de naturaleza química diversa (ej. aceptores de Michael, difenoles, quinonas, arsenicales trivalentes, metales pesados, etc) (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

El hecho de que la activación de los AREs se lleve a cabo por moléculas tan distintas sugiere que su mecanismo de activación no es del tipo ligando-receptor. Inicialmente se propuso a la proteína activadora-1 o AP1 (formada por el heterodímero Jun/Fos) como el factor de transcripción responsable de la inducción de los AREs. Sin embargo, el análisis mutacional reveló que ARE es una región amplificadora o “enhancer” tipo *cis*, con una secuencia definida como 5'-TGACnnnGCA-3', con poca afinidad por Jun/Fos. Por tanto, ARE es un elemento de respuesta independiente de AP1, y responsable de la regulación de los genes de fase II.

Posteriormente se descubrió que el factor de transcripción Nrf2 juega un papel principal en la activación transcripcional de genes que contienen AREs, y estos genes se han podido identificar mediante la utilización de microarrays (Lee *et al.*, 2003a). En cultivos primarios de astrocitos corticales de ratones Nrf2^{+/+} y Nrf2^{-/-} se observó que los astrocitos Nrf2^{-/-} poseen una actividad basal NQO1 más baja y no se inducen por tert-butil hidroquinona (tBHQ) como ocurre en los astrocitos Nrf2^{+/+}. Tanto los niveles basales como inducidos del gen de la NQO1 en astrocitos Nrf2^{-/-} son significativamente más bajos que los de astrocitos Nrf2^{+/+}. Además, la expresión de luciferasa NQO1-ARE en astrocitos Nrf2^{-/-} se revierte por la sobreexpresión de Nrf2, mientras que la activación de los AREs en los astrocitos Nrf2^{+/+} se bloquea completamente por el dominante negativo de Nrf2. La expresión de estos genes protegió a los astrocitos de la apoptosis mediada por H₂O₂. Todo esto sugiere que un cambio en la expresión génica vía Nrf2 y los AREs produce un efecto protector frente a estrés oxidativo. En otro estudio en el que se usaron cultivos primarios de neuronas corticales, se observó que las neuronas Nrf2^{-/-} son más sensibles a la rotenona, una toxina que bloquea la respiración mitocondrial, y al ionóforo ionomicina, un citotóxico que incrementa los niveles intracelulares de calcio (Lee *et al.*, 2003b). Los datos de microarrays muestran que los cultivos de neuronas Nrf2^{+/+} tienen niveles más altos de expresión de genes que codifican para enzimas de detoxificación, enzimas

antioxidantes, proteínas de la homeostasis del calcio, factores de crecimiento, proteínas específicas de neuronas y moléculas de señalización comparado con los cultivos de neuronas Nrf2^{-/-}. La sobreexpresión de Nrf2 mediante vectores adenovirales revirtió la expresión de genes que contienen AREs en cultivos de neuronas Nrf2^{-/-} y protegió a dichas neuronas frente a la muerte celular inducida por rotenona e ionomicina. Estos descubrimientos sugieren que Nrf2 juega un papel importante en protección de las neuronas frente a estímulos tóxicos.

1.1.4. El factor de transcripción Nrf2.

La identificación del factor Nrf2 está relacionada con los estudios de la proteína NF-E2, implicada en la regulación de genes de globina específicos de tejido. La caracterización de esta proteína en levaduras permitió identificar dos proteínas muy similares a NF-E2, las cuales fueron denominadas Nrf1 (Chan *et al.*, 1993) y Nrf2 (Moi *et al.*, 1994), y posteriormente se encontró un tercer factor, Nrf3, que funciona como un regulador negativo de los AREs (Sankaranarayanan *et al.*, 2004).

Los Nrfs pertenecen a una familia de proteínas básicas con una característica cremallera de leucinas (bZip) en la región C-terminal. La región básica por delante de bZip es la responsable de la unión al ADN, mientras que la región ácida se requiere para la activación transcripcional. Así mismo, estos factores poseen una región homóloga a la proteína “cap’n’collar” (CNC) de *Drosophila*, altamente conservada entre los Nrfs, cuya función aún se desconoce (Fig 4). El gen de Nrf2 (*Nfe2l2*) está formado por cinco exones interrumpidos por cuatro intrones, el primero de los cuales abarca 25 Kb. El promotor de Nrf2 es muy rico en GC y no contiene ni caja TATA ni caja CCAAT (Chan *et al.*, 1996). Dicho gen codifica para una proteína de 589 aminoácidos en el hombre y 597 en el ratón, con un peso molecular teórico de 68 KDa. Sin embargo, al ser una proteína muy ácida su movilidad electroforética se ve reducida y en geles de poliacrilamida presenta un tamaño aparente de 110 KDa.

La primera evidencia del papel de Nrf2 en protección contra estrés oxidativo proviene del estudio de Venugopal y Jaiswal en 1996, en el que se demostró que la sobreexpresión del cDNA de Nrf1 y Nrf2 aumentaba la expresión de NQO1 en respuesta a antioxidantes y xenobióticos (Venugopal *et al.*, 1996). El papel de Nrf2 se confirmó cuando se obtuvieron los primeros ratones genéticamente modificados y carentes de este factor (Nrf2^{-/-}). Los ratones Nrf2^{-/-} tuvieron un desarrollo aparentemente normal, por lo que se descartó que Nrf2 fuera esencial para la eritropoyesis murina, el crecimiento o el desarrollo. Sin embargo, estos ratones no podían inducir la expresión de los genes responsables de la detoxificación de agentes carcinógenos y de protección contra el estrés oxidativo, en particular los genes de fase II antes mencionados, como los que codifican para las enzimas NQO1, GCL, GST y HO-1 (Jaiswal, 2004). En estudios más recientes se ha demostrado que Nrf2 también contribuye a la actividad de proteasoma 26S, lo cual confirma la importante participación de este factor Nrf2 en la protección contra el estrés oxidativo y los xenobióticos.

Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, pero su actividad está estrictamente regulada. Nrf2 no se encuentra libre y activo todo el tiempo, sino únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidativo. Aunque es relativamente sencillo encontrar niveles constitutivos del ARNm para Nrf2, ha resultado difícil detectar a la proteína madura, sugiriendo su rápida degradación dentro de la célula. La vida media de Nrf2 es muy corta y se ha estimado en un tiempo menor de 20 min en macrófagos y en varias líneas celulares. El uso de inhibidores del proteasoma indica que la degradación de Nrf2 ocurre mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento del proteasoma (Kobayashi *et al.*, 2006a).

1.1.5. La proteína represora Keap1.

Los Nrfs tienen seis dominios conservados asociados a su regulación, denominados Neh (Nrf2, ECH [chicken Nrf2] homologous domain) (Fig 4). En Nrf2, estos dominios están localizados en la región N-terminal, y se ha encontrado que al eliminar al dominio Neh2 la actividad del factor se incrementa, proponiendo a dicho dominio como el sitio de interacción para unirse al represor en la célula. Un detallado análisis de la actividad de Nrf2 usando sistemas de hibridación en levaduras llevó a la identificación de la proteína Keap1 (**K**elch-like **E**CH-associated **p**rotein **1**) (Fig 4), quien suprime hasta en un 80% la translocación nuclear de Nrf2 y por lo tanto la actividad transcripcional de Nrf2. Esta interacción se ha confirmado *in vitro* y en sistemas celulares de mamíferos.

La proteína Keap1 murina está formada por 624 aminoácidos con un peso molecular de 69 kDa, y consta de cinco dominios, dos de los cuales se consideran como dominios canónicos. El primero de ellos es el dominio BTB/POZ (**B**ric-abrac, **t**ramtrack, **b**road-complex/**p**oxovirus **z**inc finger), que es un motivo evolutivamente muy conservado para interacciones proteína-proteína y se encuentra presente en proteínas que unen actina y en factores de transcripción con dedos de zinc. Además se sabe que forma complejos con otros dominios BTB (Fig 4). El otro dominio conservado se conoce como Kelch y su nombre proviene de su semejanza con la proteína reguladora Kelch de *Drosophila* donde se identificó por primera vez. Este motivo aparece repetido seis veces tanto en Kelch como en Keap1, por lo que es común encontrar a Keap1 dentro de la clasificación de la superfamilia de proteínas con repeticiones de dominios Kelch. La repetición de motivos da lugar a una estructura de hélice- β , y es a través de este dominio que se une con el dominio Neh2 de Nrf2. Al dominio Kelch se le llama también dominio de repeticiones de doble glicina (DGR) (Itoh *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2006a; Kensler *et al.*, 2007). Los otros tres dominios de Keap1 son: la región N-terminal (NTR), la región C-terminal (CTR) y la región de intervención (IVR), la cual se distingue por su alto número de residuos de cisteína. De hecho, en la proteína Keap1 murina existen 25 residuos de cisteína, mientras que la humana contiene 27. Se ha propuesto que tres de esos residuos (C151, C273 y C288) tienen la capacidad de reaccionar con ROS y otras moléculas electrofílicas.

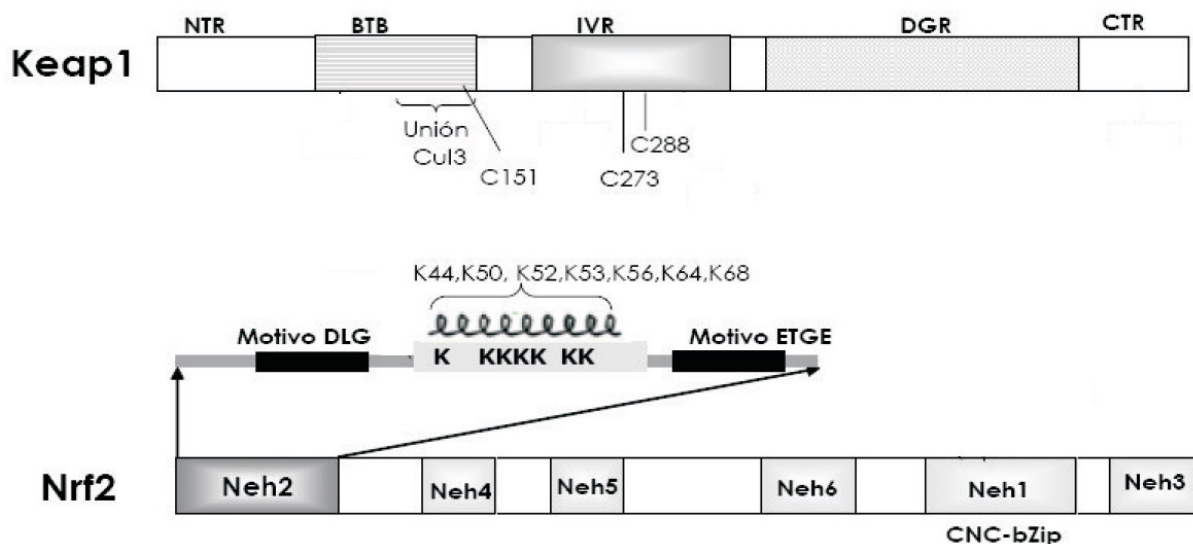


Figura 4 (modificada de Königsberg, 2007). Dominios de interacción entre Keap1 y Nrf2. Keap1. El dominio DGR proporciona el sitio de unión a Nrf2 y a β -actina, mientras que IVR y BTB contienen los residuos de cisteína capaces de oxidarse y registrar el estado oxidativo de la célula (C151, C273, C288). Nrf2. Se une a Keap1 mediante los motivos ETGE y DLG del dominio Neh2. El motivo DLG se encuentra en la región hidrofóbica, las letras D, L y G son los símbolos de los aminoácidos ácido aspártico, leucina y glicina, respectivamente, mientras que el motivo ETGE está formado a su vez por los aminoácidos ácido glutámico, treonina, glicina y ácido glutámico. En el dominio Neh2 también se encuentran siete residuos de lisina (K) que son importantes para la ubiquitinación y degradación de Nrf2 dependiente de Keap1 (Zhang *et al.* 2004).

Keap1 es un adaptador de sustratos para la ubiquitina ligasa E3 y regula los niveles de Nrf2 de una manera dependiente del estado redox celular (Cullinan *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). La interacción entre Nrf2 y Keap1 ocurre a través de un mecanismo de “doble anclaje”, llamado también mecanismo de pestillo y bisagra. En este modelo, dos motivos, ETGE y DLG, ambos en el dominio N-terminal Neh2 de Nrf2, interaccionan con dominios Kelch diferentes presentes en el homodímero de Keap1. Se cree que un único polipéptido de Nrf2 se une primero a un motivo Kelch de Keap1 a través de su motivo de alta afinidad ETGE, y esto permite que el motivo de baja afinidad DLG se una con el otro dominio Kelch presente en la otra subunidad de Keap1 (McMahon *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2006). El reconocimiento por los dos sitios tiene importancia fisiológica, ya que se ha demostrado que la delección del motivo DLG (con una afinidad dos órdenes de magnitud menor que ETGE) obstaculiza la ubiquitinación dependiente de Keap1 y la degradación por el proteasoma (Tong *et al.*, 2006; Kensler *et al.*, 2007). Además de esta interacción con Nrf2, Keap1 también se une a Cullin-3 (Cul3), formándose el complejo de ubiquitina ligasa E3 a través de la asociación con la proteína Ring-Box1 (Rbx1, también llamada Roc1). Este complejo es capaz de ubiquitinar Nrf2 y marcarlo para degradación proteasómica en un estado redox celular normal (Cullinan *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Furukawa *et al.*, 2005). Sin embargo, en presencia de oxidantes o electrófilos, las cisteínas 151, 273 y 288 de Keap1 se modifican, llevando a la disociación de la unión entre Nrf2 y Keap1. Nrf2 escapa entonces a la ubiquitinación por Cul3/Rbx1 (Zhang *et al.*, 2003; Wakabayashi *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2006b; Nioi *et al.*, 2007). Por lo tanto, modificaciones en Keap1 relacionadas con el estrés oxidativo llevan a la estabilización de Nrf2, su

acumulación en el núcleo y la transcripción de genes que contienen AREs. La modificación del complejo Nrf2/Keap1 por oxidantes o electrófilos es considerado el principal mecanismo por el cual Nrf2 se acumula e induce la expresión de genes que contienen AREs (Fig 5). Otros estudios han demostrado que la sola interacción de Keap1 (por medio del dominio Kelch) con Nrf2 (vía Neh2) es insuficiente para mantener a Nrf2 en el citosol y se ha descrito que Keap1 se asocia al mismo tiempo con el citoesqueleto (Königsberg, 2007). Al parecer Keap1 forma un multi-complejo estructural en el cual comparte sus hélices- β tanto con Nrf2 como con los filamentos de actina. Todas estas observaciones indican que el complejo Keap1-Nrf2 se forma y se retiene en el citosol mediante interacciones con el citoesqueleto (Fig 6) (Padmanabhan *et al.*, 2005; Sykiotis *et al.*, 2010).

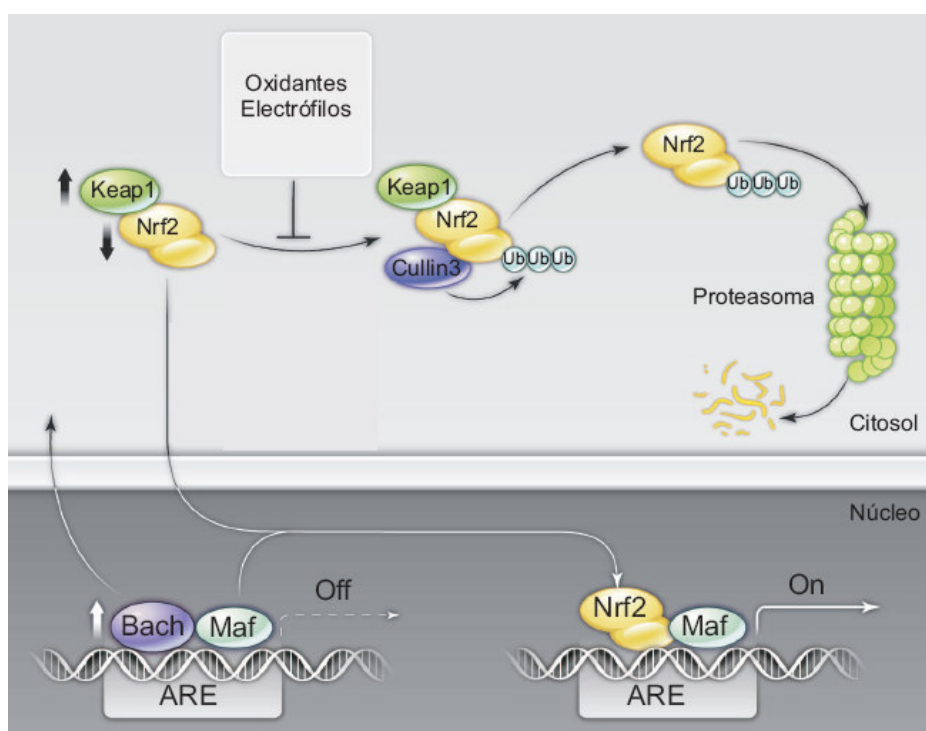


Figura 5 (modificada de Sykiotis *et al.*, 2010). Regulación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2. En condiciones basales, Keap1 marca a Nrf2 para degradación por el proteasoma a través de una poliubiquitinación mediada por Cullin-3. Los genes de fase II están inactivos, y los elementos de respuesta antioxidante (AREs) están unidos a proteínas Maf pequeñas y a factores represores como Bach1. Oxidantes, electrófilos e inductores como el sulforafano impiden la degradación de Nrf2 y facilitan su acumulación nuclear.

Recientemente se ha descrito otro modelo en el cual Keap1 se une simultáneamente con una molécula de Nrf2 y una molécula de fosfoglicerato mutasa 5 (PGAM5) y dirige a Nrf2 hacia la mitocondria (Lo *et al.*, 2006, 2008) (Fig 6). Por tanto, aún tiene que investigarse cuál de los dos modelos representa mejor la interacción entre Nrf2 y Keap 1 *in vivo*. Sin embargo, estos modelos no tienen por qué ser necesariamente excluyentes, ya que cada uno puede ser válido para diferentes dímeros de Keap1 o incluso multímeros que Keap1 podría formar (Sykiotis *et al.*, 2010).

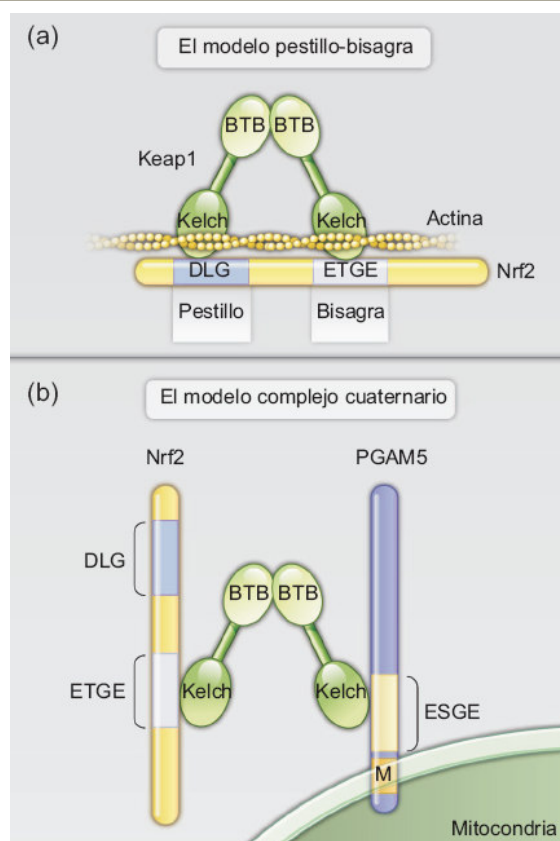


Figura 6 (modificada de Sykietis *et al.*, 2010). Dos modelos de la interacción de Keap1-Nrf2. (a) Las moléculas de Keap1 forman dímeros a través de sus dominios BTB. El modelo pestillo-bisagra propone que un dímero de Keap1 se une a una única molécula de Nrf2 a través de uniones de alta y baja afinidad con los motivos del dominio Neh2 ETGE (bisagra) y DLG (pestillo), respectivamente. Además de Nrf2, el dominio Kelch de Keap1 se une a la actina, por lo tanto uniendo el complejo Nrf2-Keap1 al citoesqueleto. (b) El modelo complejo cuaternario propone que un dímero de Keap1 se une a dos moléculas de sustrato a través de interacciones con los motivos de alta afinidad E(S/T)GE. Un dímero de Keap1 puede unir una molécula de Nrf2 y una molécula PGAM5, como se muestra en la figura, o dos moléculas de Nrf2 (no mostrado). PGAM5 tiene una señal de membrana N-terminal (M) a través de la cual el complejo Nrf2-Keap1-PGAM se une a la superficie de la membrana externa mitocondrial.

Nrf2 posee además señales de localización (NLS) y de exclusión (NES) nuclear, que están en equilibrio en condiciones basales (Jain *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Theodore *et al.*, 2008). El estrés oxidativo inactiva una de estas NES por modificación de una cisteína reactiva en el dominio Neh5, lo que facilita la acumulación nuclear de Nrf2 (Li *et al.*, 2006). Por tanto, la función de sensor de estrés oxidativo de Keap1 permite la activación de Nrf2, mientras que los efectos directos del estrés oxidativo en Nrf2 podrían modular la velocidad, magnitud y duración de la respuesta antioxidante (Li *et al.*, 2009). Además, se ha descrito recientemente un dominio insensible al estado redox celular, el dominio Neh6, localizado entre los aminoácidos 329 y 379, y que es esencial para asegurar que Nrf2 es regulado correctamente en células en condiciones de estrés oxidativo, dándole una vida media más larga, de aproximadamente 40 min (McMahon *et al.*, 2004). También se ha descrito la existencia de una NES en Nrf2 insensible al estado redox celular, lo que demuestra que la translocación de Nrf2 no es un proceso automático o pasivo (Li *et al.*, 2005).

1.1.6. Otras formas de regulación de Nrf2.

Estudios en señalización celular han sugerido que Nrf2 también puede estar regulado por fosforilación. El grupo del Dr. Cuadrado ha descrito que la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β) lleva a la exclusión nuclear e inactivación de Nrf2 (Salazar *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2008a; Rojo *et al.*, 2008b). Sin embargo, la conexión mecánica entre GSK-3 y Nrf2 no se conoce. Un gran número de estudios han demostrado que GSK-3 dirige la ubiquitinación y degradación proteasómica de varios

factores de transcripción y de otras proteínas, que incluyen Snail (Zhou *et al.*, 2004), β -catenina (Papkoff *et al.*, 1998), Gli2 y Gli3 (Pan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), Xom (Zhu *et al.*, 2002), Cdc25a (Kang *et al.*, 2008), FGD1 y 3 (Hayakawa *et al.*, 2005; Hayakawa *et al.*, 2008) y Mcl-1 (Ding *et al.*, 2007). Según esto, GSK-3 fosforila un grupo de residuos de Ser/Thr en las proteínas diana, que son reconocidos por SCF/ β -TrCP. Este complejo se une a la proteína Cullin-1 (Cul1) para formar una E3 ligasa completa por asociación con una proteína que las une llamada Skp1 y con Rbx1. Por tanto, β -TrCP es una proteína adaptadora que contiene un sitio de unión para Skp-1 llamado F-box y un dominio de reconocimiento para sustratos fosforilados (Feldman *et al.*, 1997; Skowyra *et al.*, 1997; Rada y Cuadrado, en preparación).

En 2002, el grupo del Dr. Pickett postuló que la fosforilación en la serina 40 de Nrf2 por la proteína quinasa C producía la disociación de Nrf2 y Keap1 y regulaba la expresión de los AREs (Huang *et al.*, 2002). Un año después, Bloom y Jaiswal demostraron que dicha fosforilación no es necesaria para que Nrf2 se transloque al núcleo, y que sólo Nrf2 libre es fosforilado por dicha quinasa, ya que la serina 40 se localiza en el dominio Neh2 (por el que Nrf2 se une a Keap1), lo que dificulta su fosforilación por PKC (Bloom *et al.*, 2003). Otras proteínas quinasas, como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) p38, ERK, JNK, además de la tirosina quinasa Fyn, caseína quinasa 2 (CK-2) y proteína quinasa del retículo endoplasmático (PERK) se han implicado en la regulación de los AREs (Huang *et al.*, 2000; Cullinan *et al.*, 2003; Numazawa *et al.*, 2003; Papaiahgari *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 2007; Pi *et al.*, 2007; Apopa *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009). Como respuesta al estrés oxidativo, la cascada de señalizaciones mediada por la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) produce la despolimerización de los microfilamentos de actina, facilitando la translocación nuclear de Nrf2 (Lee *et al.*, 2004).

Una vez en el núcleo, Nrf2 dimeriza con las proteínas Maf pequeñas (MafG, MafK y MafF) (Motohashi *et al.*, 2004; Katsuoka *et al.*, 2005; Blank, 2008). Existen una gran cantidad de estudios que tratan de explicar la contribución de las proteínas Maf pequeñas a la regulación de los AREs. Se ha llegado a la conclusión de que las proteínas CNC (cap'n'collar) como Nrf2 necesitan asociarse a las pequeñas Maf de manera obligatoria para poder unirse a los AREs. Una interpretación de este hecho es que las Maf pequeñas podrían contribuir tanto a la activación transcripcional como a la represión dependiendo de su compañero en el heterodímero (proteínas CNC o Bach, respectivamente) (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2000). Existen dos proteínas represoras Bach: Bach-1 y Bach-2 (Sun *et al.*, 2002, Muto *et al.*, 2004). Se ha descrito a Bach1 como el regulador principal de la expresión de HO-1, regulando la unión de Nrf2 a los AREs cuando los niveles intracelulares del grupo hemo se encuentran elevados (Ogawa *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2010).

1.2. HEMO OXIGENASA (HO).

La enzima HO cataliza la degradación del grupo hemo, generando cantidades equimolares de CO, Fe^{2+} y biliverdina (BV) por cada mol de hemo oxidado, en una reacción que requiere de O_2 y NADPH citocromo P-450 reductasa como donador de electrones. Esta última no es imprescindible, ya que se ha demostrado una inducción fuerte de la actividad HO en hígado y bazo independientemente de la NADPH citocromo P-450 reductasa (Abraham *et al.*, 2008). La subsecuente reducción de la BV a bilirrubina (BR) por acción de la biliverdina reductasa (BVR) finaliza con la degradación total del grupo hemo (Ryter *et al.*, 2002). Recientemente se ha visto que la BR puede volver a convertirse en BV en presencia de ROS (Fig 7) (Sedlak *et al.*, 2006), aunque esto ha sido cuestionado por el grupo del Dr. Stocker (Maghzal *et al.*, 2009).

Se ha descrito la existencia de dos isoformas de la HO: HO-1 y HO-2, la primera es una isoforma inducible, codificada por el gen *Hmox1*, que responde a un amplio espectro de agentes físicos y químicos, mientras que la segunda, codificada por el gen *Hmox2* no responde a la inducción por xenobióticos, siendo una isoforma constitutiva (Leffler *et al.*, 2006). Los niveles de HO-1 son bajos en la mayoría de los tejidos, mientras que HO-2 se detecta en los tejidos en ausencia de estrés (Cruse *et al.*, 1988; McCoubrey *et al.*, 1997). La HO-1 se expresa principalmente en el bazo y otros tejidos que degradan eritrocitos senescentes, incluyendo las células del sistema retículo-endotelial del hígado y de la médula ósea. Por su parte, la mayor expresión de HO-2 es en testículo, aunque es ubicua en otros tejidos sistémicos, incluidos cerebro, vasos sanguíneos, hígado, riñón e intestino. La HO-1 contribuye a la degradación del grupo hemo cuando la HO-2 está saturada (Cuadrado *et al.*, 2008).

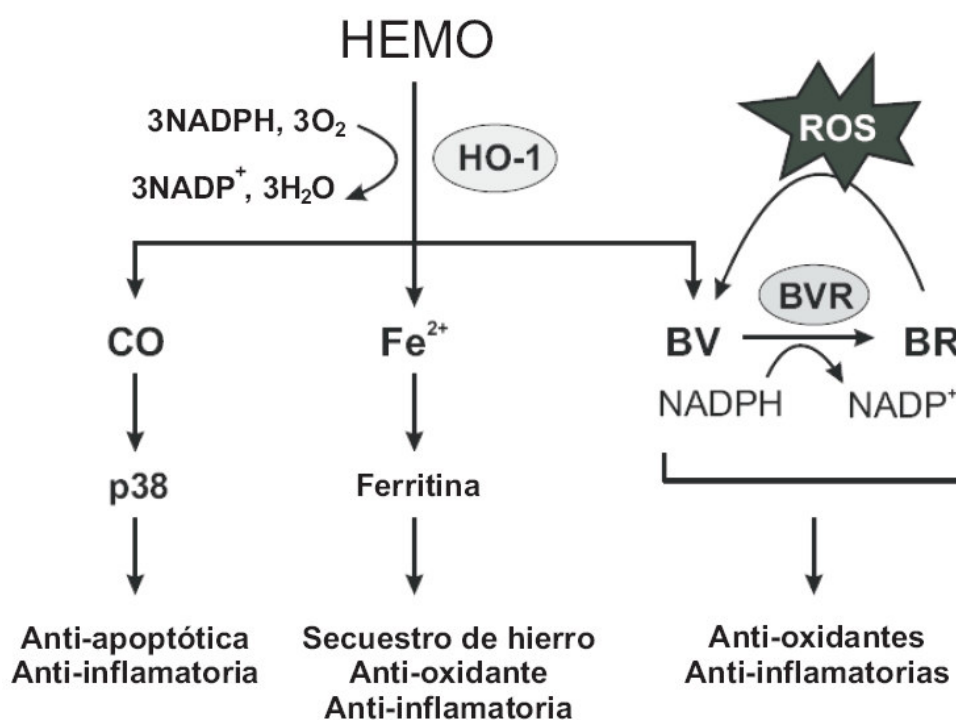


Figura 7 (modificada de Jazwa *et al.*, 2010). Productos derivados de la actividad de HO. La HO degrada el grupo hemo en BV, CO y Fe^{2+} . La BV es convertida a BR por acción de la BVR.

1.2.1. Importancia fisiológica de la HO-1.

Cuando el grupo hemo se encuentra libre en altas concentraciones en plasma, provoca daño a lípidos, proteínas y ADN a través de la generación de ROS (Kumar *et al.*, 2005). La HO juega un papel clave en el catabolismo del grupo hemo, protegiendo así contra la citotoxicidad oxidativa de este. Por ejemplo, se ha demostrado que la inducción de HO-1 atenúa los efectos tóxicos del grupo hemo en células endoteliales, y que protege al riñón de la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio (Barrera *et al.*, 2003). Así mismo, se ha observado en varios modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la expresión de esta enzima disminuye el daño celular aun cuando no existe liberación de hemo. Parece poco probable que el incremento en los niveles de HO-1 sirva como único propósito de eliminar el grupo hemo.

La HO-1 se describió inicialmente como una enzima anclada al retículo endoplasmático (Shibahara *et al.*, 1980). La HO-1 no tiene un péptido señal, pero contiene una zona de aminoácidos hidrofóbicos en el dominio C-terminal que sirven para anclarse al retículo endoplasmático. De hecho, mutantes que carecen de este dominio C-terminal no pueden anclarse al mismo (Schuller *et al.*, 1998). Estudios recientes han descrito la localización de la HO-1 en mitocondrias y caveolas (Kim *et al.*, 2004; Converso *et al.*, 2006; Slebos *et al.*, 2007). En ambos casos se ha sugerido que la liberación de CO por la HO-1 ejerce efectos citoprotectores en estas localizaciones. En las mitocondrias, la liberación del CO desacopla el complejo IV de la cadena respiratoria, lo que lleva a la producción de ROS, las cuales, actuando sobre el complejo Nrf2/Keap1 participan en la inducción de más HO-1, generándose un feedback positivo. En las caveolas, el CO liberado por la HO-1 inhibe al receptor Toll-like-4 (TLR-4) y a la NADPH oxidasa, participando en la regulación de mecanismos anti-inflamatorios en la microgía (Kim *et al.*, 2004).

La expresión de HO-1 se incrementa en respuesta a muchos estímulos, y la inducción del gen *Hmox-1* está asociado a una notable citoprotección (Nath *et al.*, 1992; Hill-Kapturczak *et al.*, 2002; Toda *et al.*, 2002). Estudios en los que se usaron ratones deficientes en HO-1 (HO-1^{-/-}) confirmaron que la HO-1 es indispensable para la supervivencia y protección de estos ratones contra estrés oxidativo. Los ratones HO-1^{-/-} mostraron mayor tasa de mortalidad y de necrosis hepática cuando se expusieron a la endotoxina LPS comparados con los ratones silvestres. Los resultados mostraron que la inducción de HO-1 sirve como un mecanismo de protección celular contra estrés oxidativo (Poss *et al.*, 1997). Se ha descrito que bajo condiciones de isquemia se incrementan los niveles de ARNm de la HO-1 en neuronas y glía de la corteza, hipocampo y tálamo de rata, siendo esta enzima importante también en protección frente a esta condición (Takeda *et al.*, 1994).

En cuanto a su localización subcelular, la HO-1 nuclear es más pequeña que la citoplasmática, ya que carece del extremo C-terminal. La HO-1 nuclear carece de actividad HO, sin embargo, media la activación de factores de transcripción implicados en la respuesta antioxidante, incluyendo la proteína activadora AP-1. Además, la HO-1 nuclear es capaz de proteger a las células frente al daño producido por H₂O₂ tan bien como la HO-1 citosólica. Por tanto, la localización nuclear de la HO-1 puede servir para inducir genes que promueven la citoprotección frente a estrés oxidativo. Esto sugiere un papel de la HO-1 en la expresión génica independiente de su papel en la degradación del grupo hemo (Lin *et al.*, 2007).

Yachie y colaboradores documentaron el primer caso humano de deficiencia de HO-1, en un niño que presentaba síntomas similares a los ratones HO-1^{-/-}, incluyendo anemia, deposición de hierro y leucocitosis, así como proteinuria persistente y hematuria, defectos en la coagulación, hiperlipidemia e hipobilirrubinemia (Yachie *et al.*, 1999). Aunque la degradación del grupo hemo ayuda a la protección de los tejidos, diversos estudios han mostrado que los productos derivados de la actividad de la HO-1 (BV, BR y CO) son los mediadores de muchas de las propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, antioxidantes e inmunomodulatorias asociadas a la inducción de HO-1.

1.2.2. Funciones citoprotectoras de los productos de la reacción catalizada por la HO-1.

Durante mucho tiempo se consideró que los productos de degradación del grupo hemo eran metabolitos tóxicos, ya que sólo se conocían los efectos adversos del Fe²⁺ y el CO, y se sabía que la BV era convertida a BR para después ser excretada. Sin embargo, se ha comprobado que dichos compuestos también ejercen efectos biológicos como antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos (Stocker *et al.*, 1987; Stocker *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 1993; Farrera *et al.*, 1994; Otterbein *et al.*, 2000a; Amersi *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2003; Ryter *et al.*, 2005; Jazwa *et al.*, 2010).

1.2.2.1. Monóxido de carbono (CO).

El CO se descubrió en el siglo XVIII y desde entonces hasta el siglo pasado, había sido considerado como un gas contaminante altamente tóxico. El efecto tóxico del CO se debe a su alta afinidad por el grupo hemo de la hemoglobina (245 veces más afin que el oxígeno) (Ryter *et al.*, 2004). El CO desplaza el O₂ de la hemoglobina formando carboxihemoglobina y con ello disminuye el transporte de oxígeno a los tejidos provocando hipoxia (Gorman *et al.*, 2003; Ryter *et al.*, 2004). Además, al unirse a los citocromos dificulta la transferencia de electrones, lo que explica su capacidad de inhibir el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. También se ha demostrado que altas concentraciones de CO incrementan la producción intracelular de H₂O₂, el cual produce [•]OH y éste a su vez produce lipoperoxidación en el cerebro (Thom, 1990; Zhang *et al.*, 1992; Piantadosi *et al.*, 1995).

Sin embargo, se ha observado que el CO activa directa o indirectamente muchas vías de señalización intracelulares que resultan en efectos vasodilatadores, antiapoptóticos, antiinflamatorios y antitrombóticos. El mecanismo por el cual el CO ejerce estos efectos incluye el aumento en la síntesis de monofosfato de guanosina-3 cíclico (GMPc) a través de la activación directa de la guanilato ciclasa soluble (GCs), lo cual activa a la p38, una MAPK implicada en la respuesta inflamatoria (Baranano *et al.*, 2001). Se ha encontrado que esta vía GCs/GMPc actúa mediando los efectos del CO en numerosos modelos (Furchgott *et al.*, 1991; Stone *et al.*, 1994). También se ha descrito que el CO participa en la estimulación de canales de potasio dependientes de calcio (Wang *et al.*, 1997), y en la activación de otras MAPKs implicadas en protección frente a estrés oxidativo (Otterbein *et al.*, 2000b; Amersi *et al.*, 2002; Ryter *et al.*, 2005). Además, se ha implicado al CO en la inhibición de la agregación plaquetaria y en la relajación de los vasos sanguíneos en el músculo liso (Brune *et al.*, 1987; Utz *et al.*, 1991).

Los niveles fisiológicos de CO son producidos por el sistema HO-1/HO-2. Como el CO es una molécula difusible que no puede ser retenida se ha sugerido que la fosforilación de HO-2 lleva a una producción rápida y controlada de CO que puede ejercer funciones de neurotransmisor, de manera similar al NO (Boehning *et al.*, 2003).

A finales de 1990 surgió la idea de desarrollar compuestos capaces de liberar CO a los sistemas biológicos, cuando se describió el papel del CO liberado por acción de la HO en diversas patologías. El CO tiene alta afinidad por los metales de transición, formando “complejos carbonílicos” muy estables. Se encontró que bajo condiciones apropiadas el $\text{Mn}_2\text{CO}_{10}$ (deca carbonilo de manganeso) y el $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2$ (dímero de tricarbonil dicloro rutenio II (CORM-2)) liberan CO a los tejidos. Estos descubrimientos dieron origen al diseño de nuevas moléculas liberadoras de monóxido de carbono (CORMs por sus siglas en inglés) para facilitar su posible aplicación farmacológica (Motterlini *et al.*, 2002).

1.2.2.2. Biliverdina (BV) y bilirrubina (BR).

La fuente principal de BV y BR la constituye la degradación del grupo hemo de la hemoglobina y de otras hemoproteínas. El catabolismo del grupo hemo tiene lugar fundamentalmente en el hígado y el bazo, por las células del sistema retículo-endotelial (Stocker, 2004).

Una vez que la HO degrada el grupo hemo produce BV, que es posteriormente reducida a BR por acción de la BVR (Tenhunen *et al.*, 1969). La BR, que es un compuesto hidrofóbico, viaja a través del plasma unida a la albúmina y al llegar al hígado es absorbida por los hepatocitos. La glutatión S-transferasa la transporta al retículo endoplasmático para ser conjugada con ácido glucurónico por acción de la UDP-glucuronosil-transferasa, lo cual hace a la BR hidrosoluble para ser eliminada por la vía biliar-fecal.

Durante mucho tiempo se ha considerado a ambos compuestos, BV y BR, como metabolitos tóxicos. Cuando existe un exceso de BR, el hígado es incapaz de metabolizarla, por lo cual se acumula provocando hiperbilirrubinemia, siendo neurotóxica en recién nacidos. Sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que la BV y BR poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiapoptótica y antimutagénica (Nakao *et al.*, 2004; Stocker, 2004; Bulmer *et al.*, 2008). En experimentos realizados con micelas de fosfolípidos, la administración de BR inhibió la lipoperoxidación de las micelas al actuar como un compuesto antioxidante, mientras que la BV actuó como un atrapador de radicales peroxilo (Stocker *et al.*, 1987).

Las propiedades de la BV y la BR de atrapar ROS como $O_2^{\bullet-}$, peróxidos, $\bullet OH$, ácido hipocloroso y oxígeno singlete (Stocker *et al.*, 1987; Stocker *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 1993; Farrera *et al.*, 1994; Kaur *et al.*, 2003) se deben a la reacción que ocurre entre los electrones del metileno del carbono 10 de la BR y las ROS, oxidando la BR a BV, un compuesto estable de baja energía que es reducido rápidamente a BR por acción de la BVR. De esta manera se establece un ciclo en el cual la BR es reutilizada continuamente, por lo cual la concentración de BR necesaria en los tejidos es muy baja comparada con los compuestos oxidantes. Por otro lado, existe evidencia que demuestra que la BV no es el producto mayoritario de la reacción entre la BR y los radicales de oxígeno como el oxígeno singlete y el dióxígeno (Stocker, 2004), lo cual sugiere que existen otros mecanismos que regeneran la BR independientemente de la BVR (McDonagh *et al.*, 1972).

Como se observa en la Fig 8, la BR y la BV contienen un gran número de dobles enlaces conjugados que son los que contribuyen a las propiedades antioxidantes de estos compuestos.

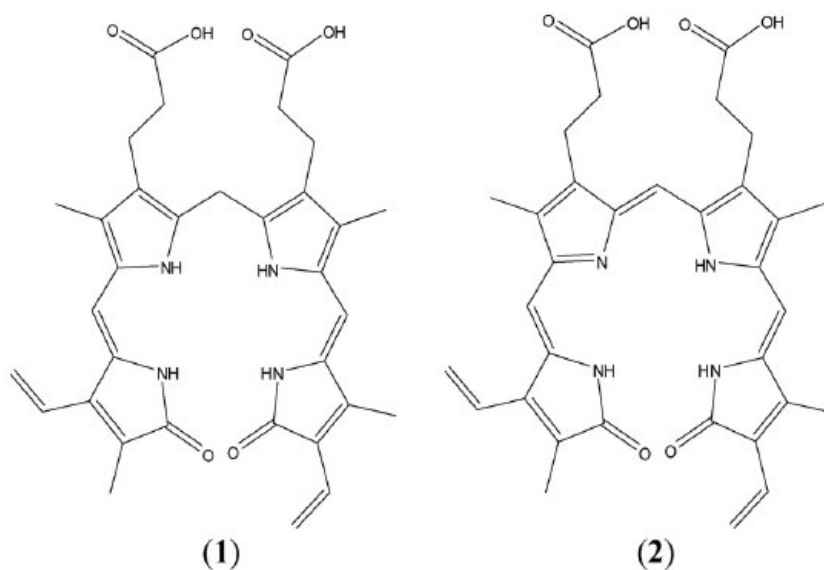


Figura 8. Estructuras químicas de 1) BR y 2) BV.

Sedlak y Snyder asociaron las bajas concentraciones de BR sérica con varias condiciones patológicas. De hecho, cantidades micromolares de BR atrapan radicales peroxilo de una manera más efectiva que el α -tocoferol, el cual se ha considerado como el antioxidante sérico más potente (Sedlak *et al.*, 2004). En otros estudios se ha demostrado que la inducción de HO-1 y la consecuente producción de BR proporcionan citoprotección en riñón, corazón y neuronas que se encuentran bajo estrés oxidativo (Dore *et al.*, 1999; Maines *et al.*, 1999; Foresti *et al.*, 2001).

1.2.2.3. Hierro.

La inducción de HO tiene como resultado el aumento en la cantidad de Fe^{2+} , el cual puede estar disponible para procesos celulares que dependen de este elemento o bien para la producción intracelular de ROS. Al liberarse del grupo hemo, el Fe^{2+} cataliza la producción de ROS, ya que facilita la descomposición de los peróxidos lipídicos a radicales alcóxilo y peróxilo y la formación del radical $\cdot\text{OH}$ a partir de H_2O_2 en la reacción de Fenton (Fig 3) (Gutteridge *et al.*, 1992).

Sin embargo, la inducción de HO-1 se acompaña de un aumento en la expresión de la ferritina (Balla *et al.*, 1992; Nath *et al.*, 1992), una proteína intracelular de alto peso molecular que secuestra el hierro intracelular limitando su capacidad prooxidante. Esto es debido a la habilidad del Fe^{2+} de unirse a las proteínas reguladoras de hierro IRP1 e IRP2, influenciando la estabilidad de los ARNm de proteínas como la ferritina, receptor de transferrina I y ferroportina I que son críticas para el procesamiento y transporte del Fe^{2+} (Kirkby *et al.*, 2006). También se ha observado que la inhibición de HO-1 disminuye la expresión de ferritina. Por tanto, la inducción de HO-1 se encuentra acompañada de un mecanismo que impide que el Fe^{2+} participe en la generación de ROS (Balla *et al.*, 1992).

1.3. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G.

Los receptores acoplados a proteínas G (del inglés **G** protein coupled-receptors, GPCRs) son la familia más grande de receptores de superficie (unos 900 miembros). Median una gran cantidad de respuestas celulares y son diana de muchos compuestos, incluyendo medicamentos. Todos los miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G se caracterizan por una única proteína que cruza la membrana plasmática siete veces, lo que resulta en siete segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular. Los siete segmentos transmembrana de todos los receptores acoplados a proteínas G se unen en una estructura con forma de anillo que forma el bolsillo de unión del ligando (Baldwin, 1994). El extremo N-terminal contiene sitios potenciales de ser glicosilados. El papel de la glicosilación no parece esencial para la unión del ligando ni para el acoplamiento del receptor a las proteínas G (Ohara *et al.*, 1990; van Koppen *et al.*, 1990). El extremo C-terminal

contiene un residuo de cisteína altamente conservado en toda la familia de receptores acoplados a proteínas G, que puede ser palmitoilado y que parece ser esencial para la función de la rodopsina y de los receptores β -adrenérgicos (O'Dowd *et al.*, 1989), pero no para la función de los receptores M1 y M2 (van Koppen *et al.*, 1991; Savarese *et al.*, 1992).

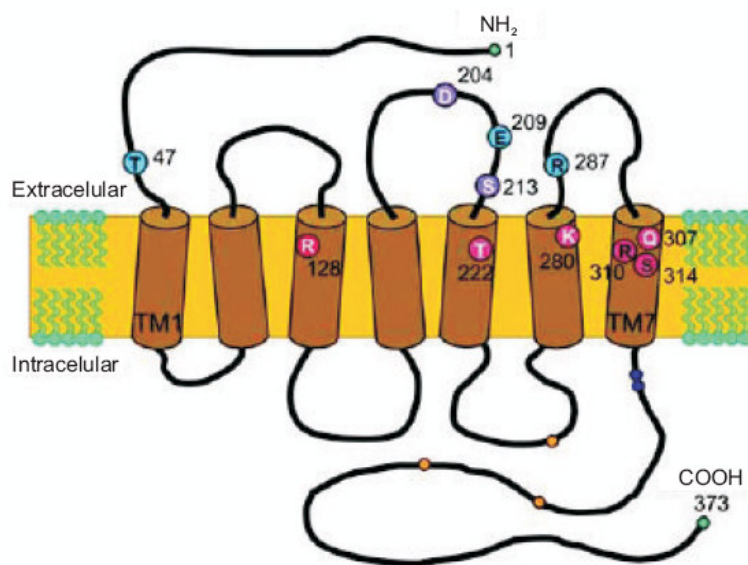


Figura 9 (modificada de Fischer *et al.*, 2007). Estructura de un receptor P2Y.

Los GPCRs señalizan a través de proteínas G heterotriméricas, las cuales a su vez están formadas por tres polipéptidos, α , β y γ , que activan diferentes enzimas (Pierce *et al.*, 2002). La subunidad α se separa de la subunidad $\beta\gamma$ e interacciona con una proteína efectora o con un canal iónico para estimular o inhibir la liberación de segundos mensajeros intracelulares. La subunidad $\beta\gamma$ tiene una función propia en señalización (Camps *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 1992). También pueden activar vías de señalización como la de PI3K/Akt (Xiong *et al.*, 2009). Tras la unión del ligando, los GPCRs son reclutados a lugares especiales de la membrana plasmática donde son endocitados. Muchos GPCRs presentan una rápida desensibilización (pérdida de respuesta) tras la unión del ligando. Los GPCRs son capaces de activar las vías de MAPKs y de PI3K mientras están siendo internalizados, pero la producción de segundos mensajeros como el AMP cíclico (AMPc) ocurre exclusivamente en la membrana plasmática (Calebiro *et al.*, 2009, Ferrandon *et al.*, 2009). La subunidad $G\alpha_s$ de las proteínas G heterotriméricas estimula la actividad de la adenilato ciclasa, una proteína transmembrana grande, incrementando los niveles de AMPc, lo que activa a la proteína quinasa A, mientras que la subunidad $G\alpha_i$ inhibe la producción de AMPc. Las subunidades $G\alpha_{12/13}$ regulan el intercambio de GDP por GTP de la GTPasa RhoA, un regulador maestro del citoesqueleto, migración celular e invasión (Worzel *et al.*, 2008). La subunidad $G\alpha_q$, por su parte, activa a la fosfolipasa (PLC)- β , que hidroliza el fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato dando lugar a inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y DAG, los cuales llevan a la movilización de calcio y a la activación de isoenzimas de la proteína quinasa C o de otras quinasas dependientes de calcio, como la calcio calmodulina quinasa (CaMK) (Felder, 1995).

1.3.1. Receptores de acetilcolina.

Los receptores de acetilcolina responden a la unión del neurotransmisor acetilcolina. La acetilcolina se libera de vesículas en las terminales presinápticas y se une a receptores de membrana nicotínicos o muscarínicos. Estos dos tipos de receptores de acetilcolina son muy diferentes en estructura y función. Los receptores nicotínicos poseen estructura pentamérica, deben su nombre a su afinidad por la nicotina, procedente de la planta *Nicotiana tabacum* y funcionan como canal iónico. La familia de receptores muscarínicos, por su parte, son receptores metabotrópicos afines por el alcaloide muscarina, procedente del hongo *Amanita muscaria*. Mediante técnicas de clonación molecular se han identificado cinco subtipos de receptores muscarínicos, llamados M1-M5, nombrados según el orden de descubrimiento (Bonner, 1989). La expresión ectópica de cada uno de estos receptores en células de mamíferos ha permitido estudiar las vías de señalización de cada uno en más detalle. Los receptores M1-M5 pueden activar diferentes vías, incluyendo la inhibición de la adenilato ciclasa por M2 o M4 (Buckley *et al.*, 1990), o su activación a través del receptor M3. El receptor M1 se acopla a la subunidad α_q de las proteínas G heterotriméricas (Felder, 1995).

Como se ha comentado anteriormente, la subunidad $G\alpha_q$ activa a la PLC- β , la cual genera dos segundos mensajeros, DAG e IP_3 , que a su vez liberan calcio del retículo endoplasmático. Estos productos activan a las PKCs clásicas. La isoforma PKC- γ es abundante en el hipocampo y co-localiza con neuronas que expresan el receptor M1 (Delmas *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2005). Los receptores muscarínicos se han implicado en plasticidad neuronal (Jerusalinsky *et al.*, 1997) y en numerosos desórdenes como la enfermedad de Alzheimer (Felder *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2002a; Fisher *et al.*, 2002b; Fisher *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2005; Youdim *et al.*, 2005; Caccamo *et al.*, 2006). Por esta razón se han utilizado inhibidores de la acetilcolinesterasa o agonistas de la acetilcolina para mantener un nivel basal de estimulación colinérgica. El receptor M1 es el más abundante en la corteza y en el hipocampo, y ha sido objeto de investigación para restaurar la función colinérgica. El grupo del Dr. La Ferla ha publicado que en ratones transgénicos que expresan proteínas humanas APP y tau mutantes se reduce la deposición de placas neuríticas y la formación de ovillos neurofibrilares en la corteza y en el hipocampo cuando se tratan con un agonista del receptor M1 (Caccamo *et al.*, 2006). Sin embargo, el papel potencial de la activación del receptor M1 en protección frente a estrés oxidativo aún no ha sido tratado, a pesar de que la producción de ROS está estrechamente relacionada con la etiopatología de varias enfermedades neurodegenerativas con disfunción colinérgica. Un estudio previo realizado en células cromafines demostró que la utilización de un agonista de receptores nicotínicos protege a dichas células del daño oxidativo a través de la inducción de HO-1 (Egea *et al.*, 2007). En esta tesis nos planteamos estudiar si el receptor M1 podría tener algún papel en protección frente a estrés oxidativo a través de la activación de la vía antioxidante Nrf2/HO-1.

Los agonistas del receptor M1 inducen la activación de diversas quinasas, como la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) (Fisher *et al.*, 2000). La enzima GSK-3 debe su nombre a su identificación inicial como una quinasa implicada en el metabolismo del glucógeno (Embi *et al.*, 1980; Woodgett, 1990). El interés en esta enzima empezó a crecer cuando se descubrió que era un miembro clave en las vías de señalización de la insulina y de Wnt. Este interés se amplificó cuando se descubrieron implicaciones de GSK-3 en la neuropatología del Alzheimer. La disfunción colinérgica es una característica importante en esta enfermedad, y empieza a ocurrir en las primeras fases de la enfermedad (Davies *et al.*, 1976; Muir, 1997). La producción de ROS también está relacionada con la progresión de esta y otras enfermedades neurodegenerativas, y contribuye a la agregación de la proteína tau y de complejos A β , que son las principales manifestaciones neuropatológicas de esta enfermedad (Mariani *et al.*, 2005).

El mecanismo más conocido de regulación es la inhibición de la actividad de GSK-3 mediante fosforilación de una serina reguladora en sus dos isoformas: la serina 9, en GSK-3 β , y la serina 21, en GSK-3 α (Woodgett, 1990). La vía de PI3K/Akt, activada en respuesta a la insulina y otros factores de crecimiento es la principal reguladora de GSK-3 porque Akt fosforila a GSK-3 en los residuos inhibitorios de serina, pero otras quinasas pueden también fosforilar estas serinas, como la proteína quinasa C o la proteína quinasa A (Grimes *et al.*, 2001). Además, la actividad enzimática de GSK-3 aumenta por fosforilación de la tirosina 216 en GSK-3 β , y la tirosina 279 en GSK-3 α , pero sus mecanismos de regulación todavía no están claros, ya que todavía no se han identificado las tirosina quinasas y fosfatasas implicadas (Simon *et al.*, 2008).

1.3.2. Receptores P2.

Los receptores P2 son receptores de membrana para nucleótidos extracelulares. La letra “P” indica su activación por purinas o pirimidinas, mientras que el número “2” los diferencia del grupo de los receptores P1, activados por adenosina (Burnstock, 1972). En 1985 se propuso la clasificación farmacológica de los receptores P2 en dos subfamilias, receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Burnstock *et al.*, 1985). Hasta la fecha se han clonado siete subunidades de los receptores P2X, cuya nomenclatura ha sido actualizada recientemente por el Comité de Nomenclatura de la IUPHAR a P2X1-7 (Collingridge *et al.*, 2009). Por su parte los receptores P2Y cuentan con ocho miembros (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄), cuya nomenclatura aún no ha sido actualizada.

La clasificación farmacológica de los P2Y se hace en función de la afinidad que los distintos subtipos muestran frente a los nucleótidos de adenina y uridina. Estas respuestas varían en potencia dependiendo de las especies. En función de esto, los receptores se dividen en tres grupos. El primero está formado por los receptores P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₁, que son activados únicamente por

nucleótidos de adenina (ATP/ADP). En el segundo grupo se encuentran el P2Y₂ humano y el P2Y₄ en roedores, que responden tanto a nucleótidos de adenina como de uracilo, y el P2Y₄ humano, P2Y₆, y P2Y₁₄ que responden preferentemente a nucleótidos de uracilo UTP/UDP y, en el caso del P2Y₁₄ a UDP-glucosa (Sak *et al.*, 2002; Abbracchio *et al.*, 2003; Burnstock, 2004). Los receptores de los que se conocen un mayor número de funciones asociadas, el P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁ están acoplados predominantemente a PLC- β y a la movilización de las reservas intracelulares de calcio. El P2Y₁₁, además, es el único que está acoplado a la activación de la adenilato ciclasa vía G α s. Los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, por su parte, tienen en común su acoplamiento a la inhibición de la adenilato ciclasa vía G α i (Ralevic *et al.*, 1998; von Kugelgen *et al.*, 2000; Abbracchio *et al.*, 2003).

Los receptores P2Y aparecen en pasos muy tempranos de la evolución, como por ejemplo en la raya *Raja erinacea*, sugiriendo que los receptores de nucleótidos están entre los más antiguos receptores extracelulares expresados en el reino animal (Dranoff *et al.*, 2000). Constitutivamente o bajo determinadas situaciones los receptores P2Y pueden formar homo o heterodímeros, quizás para dotar de mayor estabilidad a su estructura. Un ejemplo es la homodimerización del P2Y₁ o del P2Y₆ como consecuencia de la exposición continuada al agonista, probablemente de forma previa a su internalización y renovación (Marchese *et al.*, 1999; D'Ambrosi *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008).

Los receptores P2Y activan sus vías de señalización por medio de diferentes familias de proteínas G. La mayoría de ellos (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁) se asocian principalmente a la G α q (Volonte *et al.*, 2006). Además, pueden estar acoplados a la adenilato ciclasa, siendo el P2Y₁₁ el único que puede asociarse con la G α s (Communi *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2002). El receptor P2Y₂ puede asociarse con G α i (Janssens *et al.*, 1999), aunque este acoplamiento es más característico de la subfamilia formada por los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Chambers *et al.*, 2000; Communi *et al.*, 2001; Hollopeter *et al.*, 2001). Existen diversos estudios en líneas celulares que indican que ciertos P2Y pueden acoplarse a distintas familias de proteínas G en función del agonista que los estimule, por ejemplo, el P2Y₁₃ puede unirse simultáneamente a G α i/G α s o a G α ₁₆ (Marteau *et al.*, 2003).

Como ocurre con la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, la activación de los P2Y está también frecuentemente asociada a la activación de las MAPKs, especialmente de las ERK1/2. Esta activación se produce por medio de diferentes vías de señalización, según el receptor implicado y el tipo celular (Abbracchio *et al.*, 2006; Erb *et al.*, 2006; Neary *et al.*, 2006b). Por ejemplo, el P2Y₂ activa las ERK vía G α q/PLC- β /PKC/Ras/Raf/MEK. Mientras que el P2Y₁₂ puede activar distintas respuestas, como proliferación mediada por las ERK vía G α i/RhoA/PKC, diferenciación vía G β γ /Src/Pyk2/Rap1/Akt, o agregación en las plaquetas vía G β γ /PI3K/Akt y también por medio de G α _{12/13}/RhoA/Rho quinasa (Moers *et al.*, 2003; Van Kolen *et al.*, 2006a; Van Kolen *et al.*, 2006b). Los receptores P2Y también pueden regular la actividad de GSK-3 (Neary *et al.*, 2006a). El grupo de

la Dra. Miras-Portugal demostró el acoplamiento de la señalización del receptor P2Y₁₃ a la fosforilación en serina e inhibición catalítica de GSK-3, vía Gβγ/PI3K/Akt, provocando la estabilización y translocación al interior del núcleo del regulador transcripcional y sustrato de la proteína GSK-3, β-catenina (Ortega *et al.*, 2008). Recientemente se ha descrito también la regulación de la endocitosis de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en hepatocitos por parte de este receptor, a través de una vía dependiente de RhoA/ROCK I (Malaval *et al.*, 2009).

Los receptores P2Y se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo de todo el Sistema Nervioso y median importantísimas funciones en este sistema, como son la plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores y la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroregeneración. Los receptores P2Y también están asociados en el Sistema Nervioso a la señalización trófica y degenerativa. Sus acciones pueden contribuir al crecimiento celular, proliferación, diferenciación o muerte a través de vías de señalización mediadas por PLA2, PLD, MAPK y Akt (von Kugelgen *et al.*, 2000; Brambilla *et al.*, 2002; Volonte *et al.*, 2003). Los P2Y activan de forma transitoria las ERK, junto con proteínas activadas por estrés (JNK, p38 y Big MAPK-1 (ERK5)) vía cRaf1 o activadores de MEK (Widmann *et al.*, 1999; Erb *et al.*, 2006).

Recientemente se ha descrito un papel citoprotector de los receptores P2Y₁ frente a estrés oxidativo en astrocitos (Shinozaki *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2009), pero el papel neuroprotector de los receptores P2Y en neuronas no se ha documentado. Aunque ya se ha descrito un papel neuroprotector de los receptores P2Y en neuronas granulares de cerebelo (NGCs) cultivadas con bajas concentraciones de KCl (Vitolo *et al.*, 1998), la identificación del receptor específico y su participación en protección frente a estrés oxidativo no se conoce. En esta tesis nos planteamos analizar el papel protector de un análogo del ADP en NGCs de roedores, a través de la activación de la vía antioxidante Nrf2/HO-1.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1.-** Estudio de la regulación del eje Nrf2/hemo oxigenasa-1 (HO-1) por señales que activan receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas en el cerebro. En concreto nos centramos en el receptor muscarínico M1, un receptor de acetilcolina, y en el purinérgico P2Y₁₃, un receptor de nucleótidos extracelulares.
- 2.-** Estudio del posible papel neuroprotector de estos receptores. Nos planteamos la posibilidad de que la inducción de la enzima HO-1 producida por la activación de estos receptores pudiera proteger frente a la muerte celular y el estrés oxidativo inducidos por toxinas como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).
- 3.-** Estudio de la regulación farmacológica de la vía Nrf2/HO-1 por el ácido nordihidroguayarático (NDGA) y efecto sobre la viabilidad celular en presencia de estrés oxidativo inducido por ácido 3-nitropropiónico (3-NP) o H₂O₂.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVO CELULAR.

En la tabla 1 se detallan los reactivos utilizados, su procedencia (casa comercial) y el número de catálogo correspondiente.

Tabla 1. Reactivos utilizados en los cultivos celulares.

Reactivo	Casa comercial	Número de catálogo
Citosina β -D-arabinofuranósido (Ara-C)	Sigma Aldrich	C6645
Desoxirribonucleasa I (DNaseI)	Sigma Aldrich	D5025
Gentamicina	Normon	763011
Hank's balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma Aldrich	H6648
L-glutamina	Invitrogen	25030-123
Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	Invitrogen	52100-039
Medio Neurobasal	Invitrogen	12348-017
Medio Neurobasal-A	Invitrogen	12349-015
Penicilina/Estreptomicina	Invitrogen	15140-122
Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B	Sigma Aldrich	A5955
Poli-D-lisina (Poli-D-lys)	Sigma Aldrich	P1024
Suero bovino fetal (FBS)	Invitrogen	10270-106
Suero de caballo (HS)	Invitrogen	16050-122
Suplemento B-27	Invitrogen	10889-038
Tripsina	Sigma Aldrich	T1426
Tripsina-EDTA	Invitrogen	25300-054

3.1.1. Animales.

Se emplearon ratones macho C57BL/6 (*Charles River Breeding Laboratories*) y ratas macho Wistar (animalario de la Facultad de Medicina, UAM). Se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C) con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y proporcionándoles agua y comida *ad libitum*. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con las guías institucionales de la UAM.

3.1.2. Cultivos primarios.

El cerebelo es una zona de gran importancia dentro del cerebro que está presente desde los vertebrados más antiguos. Histológicamente está formado por una capa externa de materia gris denominada *corteza cerebelosa*, una zona más interna de *materia blanca* y tres partes de *núcleos profundos* llamados núcleo dentado, fastigial e interpuesto. La corteza cerebelosa a su vez se divide en tres capas, que de la superficie al interior se denominan *molecular*, *intermedia* (o de células de Purkinje) y *granular*. La capa granular está formada principalmente por las pequeñas y numerosísimas *células granulares*, pequeñas neuronas con un soma de tamaño entre 6 y 10 μm , con un núcleo denso, que constituyen el tipo neuronal más abundante del cerebro (del orden de 10^{11} en humanos) y el 90% de las neuronas cerebelares. En la arquitectura del cerebelo ocupan una posición central, siendo la principal fuente de inervación hacia las neuronas de Purkinje, con las que forman una red sináptica ortogonal perfectamente organizada y eficaz.

Por otro lado, el hipocampo es una de las principales estructuras del cerebro de los mamíferos. Pertenece, por una parte al sistema límbico y por otra a la arquicorteza, componiendo junto al *subículo* y el *giro dentado* la llamada *formación hipocampal*. Al igual que el resto de la corteza cerebral es una estructura pareada, con dos mitades que son imágenes especulares en ambos hemisferios cerebrales. Tanto en humanos como en otros primates, el hipocampo se localiza en el interior de la parte medial o interna del lóbulo temporal, bajo la superficie cortical. La forma de caballito de mar es típica de primates, pero en otros mamíferos tiene formas variadas, como la de banana.

- Establecimiento de cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo.

Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGCs) se prepararon a partir de ratas Wistar de 7 días de vida o de ratones silvestres y nulos para Nrf2 de 5 días de vida. Después de extraer los cerebelos, se les retiró cuidadosamente las meninges, se trituraron con una hoja de bisturí y se incubaron a 37°C durante 15 min con solución de tripsina (1% de tripsina disuelta en HBSS, 1,2 mM MgCl_2 , 3% BSA y 50 U/ml de DNasa I). Después, se añadió una solución de parada de la tripsina (0,720 mM MgCl_2 , 20% FBS y 40 U/ml de DNasa I disueltos en HBSS) y los cerebelos se centrifugaron a $122 \times g$ durante 5 min. El pellet se resuspendió en la misma solución y las células se disociaron mecánicamente con pipetas Pasteur cerradas a la llama, cada una con la abertura más pequeña que la anterior. Las células se centrifugaron a $122 \times g$ durante 10 min y se sembraron en placas pretratadas con poli-D-lys a una densidad de 500.000 células/ml. El medio de cultivo fue medio Neurobasal A-B27 (B27 sin antioxidantes), además de 25 mM de KCl, 1 mM de glutamina, y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomicina y 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B). A las 24 h se añadió Ara-C (10 μM) a los cultivos para impedir la proliferación de células gliales. Las neuronas se usaron entre 10-14 días *in vitro* (DIV) en el caso de las ratas y entre 7-10 DIV en el caso de los ratones. Los agonistas nucleotídicos (2MeSADP y ADP) son de Sigma Aldrich, mientras que los antagonistas nucleotídicos (MRS2179 y MRS2211) son de Tocris Bioscience. La toxina pertussis (PTX) es de Calbiochem Co.

- Establecimiento de cultivos primarios de neuronas de hipocampo.

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo (NH) se prepararon a partir de embriones de 18 días de ratas Wistar. Las células se sembraron en placas pretratadas con poli-D-lys y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero de caballo durante 2 h. Después, los cultivos se pasaron a medio Neurobasal (especial para células pre-natales) suplementado con B27 (B27 sin antioxidantes), 2 mM de glutamina, 0,1 mg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina. A los 3 *DIV* se les añadió Ara-C (10 μ M) para reducir el número de células no-neuronales. Los cultivos se usaron a 10 *DIV*.

3.1.3. Líneas celulares.

Células de feocromocitoma, PC12: línea celular derivada de un feocromocitoma (tumor de células cromafines de médula adrenal) de rata (Greene *et al.*, 1976). Son células productoras de catecolaminas, dopamina y norepinefrina. Se transfectan con lipofectamina o con lipofectamina 2000 con una eficiencia del 50-60%. Responden al factor de crecimiento nervioso (NGF) diferenciándose a neurona simpática, por lo que son muy útiles como modelo neuronal en estudios de diferenciación y estudios de vías de señalización activadas por esta neurotrofina. Proceden del laboratorio de la Dra. Hynda Kleinman (NICDR, Bethesda, MD, EEUU). Crecen en medio DMEM suplementado con un 7,5% de FBS y un 7,5% de HS al que se añadieron 80 μ g/ml del antibiótico gentamicina.

Células embrionarias humanas de riñón, HEK293T: línea celular procedente de células embrionarias de riñón humano. Son células HEK293 transformadas por la expresión del antígeno T del virus SV40. Resistentes a G418. Proceden del Ciemat (Madrid, España). Se transfectan muy bien con fosfato cálcico (eficiencia del 90%). Crecen en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS al que se añadieron 80 μ g/ml del antibiótico gentamicina.

Células de neuroblastoma, N2A: línea celular procedente de un neuroblastoma de ratón. En ausencia de suero se diferencian emitiendo neuritas. Se transfectan bien con Transfast (Promega) y con lipofectamina 2000 con una eficiencia del 50-60%. Proceden del laboratorio de la Dra. Ana Pérez (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid, España). Crecen en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS al que se añadieron 80 μ g/ml del antibiótico gentamicina.

Fibroblastos embrionarios de ratón, MEFs: procedentes del laboratorio del Dr. Ken Itoh (Hirosaki, Japón). Los MEF silvestres y nulos para Nrf2 se prepararon a partir de embriones de ratones C57BL/6 de 13,5 días de vida (Nioi *et al.* 2003). Crecen en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS al que se añadieron 2 mM glutamina, 200 U/ml de penicilina y 0.2 mg/ml de estreptomicina.

Todos los cultivos y líneas celulares descritas se mantuvieron en un incubador a 37°C de temperatura y 5% de CO₂.

3.2. PLÁSMIDOS.

En la tabla 2 se detallan los vectores de expresión utilizados, su procedencia y algunas observaciones de interés.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en las transfecciones transitorias.

Nombre	Procedencia	Observaciones
pHO1-15-LUC	Dr. Jawed Alam	Plásmido reportador de luciferasa que contiene 15 kb del extremo 5' del promotor murino de la HO-1
HRE 3.2-LUC	Dr. Jawed Alam	Plásmido reportador de luciferasa que contiene tres elementos de respuesta antioxidante (AREs) del promotor murino de la HO-1 colocados en tándem
Gal4-LUC	Dra. Rosario Perona	Plásmido reportador de luciferasa que contiene el dominio de unión al ADN del factor Gal4 de levaduras
pGL3-basic vector	Promega, España	Vector sin promotor utilizado para normalizar los ensayos de luciferasa (sólo lleva LUC)
pcDNA 3.1		
pcDNA3.1-V5HisTOPO-P2Y ₁₃	Dra. Marta Fumagalli	Expresa el receptor purinérgico P2Y ₁₃
pcDNA3.1-Gα _q Q209L	Dr. J. Silvio Gutkind	Mutante constitutivamente activo de la subunidad α _q de las proteínas G heterotriméricas
pcDNA3.1Gα _q -Ct	Dr. Ken Arai	Mutante de la subunidad α _q de las proteínas G heterotriméricas que no permite su acoplamiento al receptor
pcDNA3.1V5HisBmNrf2	Dr. John D. Hayes	Expresa el factor de transcripción Nrf2 murino con una etiqueta de 6 histidinas y otra etiqueta de V5
pcDNA3.1V5HisBmNrf2S40A		Mutante constitutivamente activo de Nrf2 ya que carece de la serina en posición 40. Generado con el kit de mutagénesis dirigida Gene Tailor (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante, utilizando los cebadores directo 5'-GTCGAGAAGTGTTTGACTTTGCTCAGCGACAG-3' y reverso, 5'-AAAGTCAAACACTTCTCGACTTACTCCAAG-3'
pcDNA3.1GBDX-Nrf2		Expresa el dominio de unión al ADN del factor Gal4 de levaduras y el dominio de transactivación de Nrf2 (Gal4-Nrf2)
pEFΔNrf2-DN	Dr. Jawed Alam	Dominante negativo de Nrf2, que carece del extremo de transactivación y por tanto es inactivo
pCEFL	Dr. J. Silvio Gutkind	
pCEFL-M1	Dr. J. Silvio Gutkind	Expresa el receptor muscarínico M1
pCEFL-Gβ1	Dr. J. Silvio Gutkind	Expresa la subunidad β de las proteínas G heterotriméricas

Nombre	Procedencia	Observaciones
pCEFL-C γ 2	Dr. J. Silvio Gutkind	Expresa la subunidad γ de las proteínas G heterotriméricas
pMV7gpt-fosfolipasa C (PLC)- β		Expresa la fosfolipasa-C β
pMT2-PKC-I		Expresa la proteína kinasa C- γ
pCGN-HA-GSK3 β -(Y216F)		Mutante inactivo de GSK-3 β porque carece de la tirosina en posición 216. Lleva una etiqueta de HA.
pCGN-HA-GSK3 β - Δ 9	Dr. Akira Kikuchi	Mutante constitutivamente activo de GSK-3 β porque carece de la serina en posición 9. Lleva una etiqueta de HA.
psPAX2 (vector lentiviral)	Dr. Trono Didier	Expresa las proteínas de la cápsida del virus
pMD2G (vector lentiviral)	Dr. Trono Didier	Expresa la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular
pWPXL (vector lentiviral)	Dr. Trono Didier	
pWPXL-M1 (vector lentiviral)		Generado en dos pasos: en el primero, la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente se reemplazó por un cebador clonado entre los sitios BamHI y EcoRI del vector pWPXL (directo: 5'-CGCGTATTCGGTCACCGTAAG-3' y reverso: 5'-AATTCTTACGGTGACCGAATA-3'), en el segundo, el fragmento EcoRI/NotI del vector pCEFL-M1, conteniendo la secuencia codificante completa del receptor M1, se subclonó en los sitios EcoRI/SmaI de esta versión modificada de pWPXL.

3.3. PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS.

1) Materiales.

- **HBS2X** (HEPES-buffered saline), composición por cada 50 ml: 818 mg NaCl, 11,7 mg Na₂HPO₄·2H₂O, 595 mg HEPES y 40 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7,08 con NaOH 1 N. Se añadió agua destilada hasta 50 ml. Se filtró (0,2 μ m) y guardó a -20°C en alícuotas de 5-10 ml.
- **2,5 M CaCl₂**: se disolvieron 18,37 g de CaCl₂·2H₂O en 50 ml de agua destilada. Se filtró y guardó a -20°C en alícuotas de 1 ml.

2) Producción de lentivirus.

Los lentivirus se hicieron mediante transfección con fosfato cálcico de los vectores lentivirales psPAX2, pMD2G y pWPXL-M1 en células HEK293T, siguiendo el protocolo siguiente:

Día 1: Las células HEK293T se sembraron en placas de 150 mm de diámetro a una densidad de 11×10^6 células/placa, con 25 ml de DMEM 10% FBS 1% glutamina (tres placas por virus). Se dejaron crecer a 37°C durante 16 h.

Día 2: Una hora antes de la transfección, se retiraron 5 ml de medio de la placa. Las células deben estar aproximadamente al 70% de confluencia.

- Transfección con fosfato cálcico:
 - a) Se mezclaron los ADNs y agua estéril en un tubo:
 - i) pMD2G, que codifica para la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular: 10 µg
 - ii) pSPAX2, que codifica para las proteínas de la cápsida: 15 µg
 - iii) Plásmido de interés (pWPXL-M1): 20 µg
 - iv) Agua estéril hasta 1800 µl
 - b) Se añadieron 200 µl de CaCl₂ 2,5 M mediante goteo y se mezclaron.
 - c) Se añadieron 2 ml de HBS2X mediante goteo, lentamente, y después se mezclaron en remolino (unos 15 segundos).
 - d) Inmediatamente después, se añadieron los 4 ml de la solución directamente sobre la superficie del medio mediante goteo moviendo la placa al mismo tiempo.
 - e) Las células se incubaron a 37°C durante 8 h.
- Tras las 8 h, se retiró el medio de la transfección cuidadosamente y se añadieron 12 ml de DMEM 10% FBS 1% glutamina por placa. Se incubaron las células a 37°C durante 48 h.

Día 4: tras las 48 h, se recogió el medio (que contiene los virus) y:

- Se centrifugó a 4000 \times g durante 5 min.
- El sobrenadante se filtró a través de 0,45 µm (antes de filtrar el sobrenadante, se filtraron 5 ml de DMEM 10% FBS 1% glutamina).
- Una vez filtrado, el sobrenadante se concentró a través de *Millipore Centricon Plus-20 100K* (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se guardó a -70°C en alícuotas (5-50 µl).

Nota: Antes de procesar el sobrenadante, se miraron las células HEK293T en un microscopio de fluorescencia, para obtener un porcentaje aproximado de células productoras de virus (alrededor de un 80%). Estas células productoras de virus tienen una morfología diferente a la de las células normales, ya que son más redondeadas y refringentes. También se tienen que observar áreas vacías en la placa.

Día 5: los lentivirus se titularon por inmunofluorescencia mediante infección en células HEK293T (apartado 3.6). Los títulos finales fueron de aprox. 10⁶ partículas infectivas/ml.

3.4. ENSAYOS DE LUCIFERASA.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (75.000 células/pocillo), y a las 16 h se les retiró el medio y se transfectaron en medio sin suero con una mezcla de ADN consistente en 300 ng del plásmido reportero correspondiente y hasta 900-1200 ng de ADN total, utilizando lipofectamina (Invitrogen). Las células se incubaron con los complejos de ADN y lipofectamina durante 5 h y posteriormente se mantuvieron durante 16 h con los tratamientos correspondientes en medio sin suero, con el objetivo de evitar que factores de crecimiento presentes en el suero puedan activar cascadas de

señalización. La actividad luciferasa se midió con el sistema de Promega según las instrucciones del fabricante, y las unidades relativas de luz se midieron en un luminómetro BG1 Optocomp I, GEM Biomedical (Optocomp Corp., Sparks, NV, EEUU). Los valores de actividad luciferasa obtenidos con el plásmido reportero correspondiente (ARE-LUC, pHO1-15-LUC o Gal4-LUC) se normalizaron con los obtenidos con el vector pGL3basic (Promega) en las mismas condiciones y se presentaron como veces de incremento sobre las células transfectadas con plásmido vector control o sobre las células sin tratar. En el caso de las NGCs, se sembraron 500.000 células/pocillo y a los 10 *DIV* se transfectaron en medio Neurobasal-A sin B27 y sin antibiótico con 1 µg del plásmido reportero correspondiente (ARE-LUC o pGL3basic como control) utilizando Neuromag (OZ Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con los complejos de ADN y Neuromag durante 24 h y posteriormente se mantuvieron en medio Neurobasal-A sin B27 y sin antibiótico durante 16 h con los tratamientos correspondientes. La actividad luciferasa se midió con el sistema de Promega. Todos los ensayos de luciferasa se realizaron por triplicado, utilizando 3-4 pocillos para cada condición experimental.

3.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOBLOT.

Las células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro (500.000 células/placa) y se mantuvieron en medio con 0,25% de suero durante las 16 h anteriores a las estimulaciones. En el caso de los cultivos primarios de neuronas, las células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro a una densidad de 500.000 células/ml (2 millones células/placa). A los 10 *DIV* se pusieron los tratamientos correspondientes. Para la detección de receptores de membrana, las células se lisaron antes de poner los tratamientos.

Tras los tratamientos, las células se lavaron una vez con PBS1X frío y se lisaron en hielo con ayuda de un raspador con 200 µl de tampón de lisis (1 % Nonidet P-40, 10 % glicerol, 337 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 µg/ml leupeptina, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 20 mM NaF, 1 mM NaPPi y 1 mM Na₃VO₄). Los lisados se centrifugaron a 18220 *x g* durante 15 min, y se recogieron los sobrenadantes en tubos eppendorf nuevos. Se analizó la concentración de proteínas mediante el kit *BioRad DC protein assay* (compatible con detergentes y basado en el método de Lowry) y posteriormente se añadió el tampón de carga de proteínas a las muestras (50 mM Tris-HCl pH 6,8, β-mercaptoetanol, 2% dodecil-sulfato sódico (SDS), azul bromofenol y 10% glicerol). Las muestras se hirvieron a 90°C durante 5 min y se corrieron en geles de poliacrilamida utilizando el sistema Mini-PROTEAN 3 de BioRad. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore) y se hicieron los *immunoblots* correspondientes (Advanced ECL, GE Healthcare). Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se analizaron por densitometría con el software *MCID Image Analysis* (InterFocus Imaging Ltd, Cambridge, Inglaterra). Los valores de densitometría se obtuvieron de tres muestras de cada condición experimental.

3.6. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

Las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro (1 millón células/placa) y se mantuvieron en medio con 0,25% de suero durante las 16 h anteriores a las estimulaciones. Para las transfecciones transitorias, las células se transfectaron 16 h después de sembrarlas, y 24 h después de la transfección se pusieron los tratamientos correspondientes en medio sin suero. En el caso de las NGCs, las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro a una densidad de 500.000 células/ml (4 millones células/placa). A los 10 *DIV* se pusieron los tratamientos correspondientes.

Tras los tratamientos, las células se lavaron una vez con PBS1X frío y se lisaron en hielo con 300 µl de tampón A frío (20 mM HEPES, pH 7,0, 0,15 mM EDTA, 0,015 mM EGTA, 10 mM KCl, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, 1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF y 1 µg/ml leupeptina). El homogenado se dejó en tubos eppendorf a 4°C durante 15 min. Después, el homogenado se centrifugó a 837 *x g* durante 10 min, los sobrenadantes se guardaron como fracciones citosólicas y los pellets (núcleos) se lavaron cuidadosamente con 500 µl de tampón B frío (10 mM HEPES, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, 25% glicerol, 0,1 M NaCl, 1 mM PMSF y 1 µg/ml leupeptina). Se centrifugó a 837 *x g* durante 10 min y se desechó el sobrenadante, para retirar bien los restos de proteínas citosólicas. Los pellets (núcleos) se resuspendieron en 200 µl de tampón C frío con 2% SDS (10 mM HEPES, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, 25% glicerol, 0,4 M NaCl, 1 mM PMSF y 1 µg/ml leupeptina), y posteriormente se sonicaron para romper el ADN. Las fracciones citosólicas y nucleares se corrieron en geles de poliacrilamida utilizando el sistema Mini-PROTEAN 3 de BioRad. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore) y se hicieron los *immunoblots* correspondientes (Advanced ECL, GE Healthcare). Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se analizaron por densitometría con el software *MCID Image Analysis* (InterFocus Imaging Ltd, Cambridge, Inglaterra). Los valores de densitometría se obtuvieron de tres muestras de cada condición experimental.

3.7. INMUNOFLUORESCENCIA.

Para las inmunocitoquímicas, los cultivos primarios de neuronas se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 12 mm de diámetro (VWR) pretratados con poli-D-lys, a una densidad de 500.000 células/ml. A los 10 *DIV* se les retiró el B27 y el antibiótico durante 2 h, y posteriormente se pusieron los tratamientos correspondientes. Tras los tratamientos, las células se lavaron una vez con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a 25°C en agitación. Después, las células se lavaron tres veces con PBS1X y se permeabilizaron con Nonidet P-40 (disuelto al 0,25% en PBS1X) durante 10 min a 25°C en agitación. Se lavaron tres veces con PBS1X y se puso el anticuerpo primario correspondiente en una caja húmeda a 37°C a una dilución 1:50 en PBS1X. Tras retirar el anticuerpo primario las células se lavaron tres veces y se puso el

anticuerpo secundario correspondiente en las mismas condiciones que el primario a una dilución 1:200. Posteriormente las células se lavaron con 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (Molecular Probes) durante 5 min a 25°C en agitación, para teñir los núcleos. Tras el DAPI las células se lavaron una vez con PBS1X y después con agua destilada. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de vidrio (Thermo Scientific) utilizando el montador *Prolong Gold Antifade Reagent* (Molecular Probes). Los portaobjetos se dejaron 24 h a 25°C en oscuridad, y las imágenes de fluorescencia se tomaron con un microscopio Axiophot Zeiss (Zeiss), con filtros de excitación de 450/90 nm para el verde y de 365/12 nm para el DAPI.

Tabla 3. Anticuerpos primarios usados para *immunoblot* (IB) e inmunofluorescencia (IF).

Antígeno	Especie	Proveedor	Dilución	
			IB	IF
HO-1	Ratón	Stressgen Assay Designs	1:1000	
HO-1	Conejo	Millipore	1:1000	1:50
Nrf2	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	1:500	1:50
β-actina	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	
α-tubulina	Mouse	Sigma Aldrich	1:5000	
Lámina B	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	
Fosfo-GSK-3β (S9)	Conejo	Cell Signaling	1:1000	
GSK-3β	Ratón	BD Biosciences	1:1000	
Receptor M1	Conejo	Millipore	1:500	
Caspasa-3 activa	Conejo	Cell Signaling	1:1000	
β-catenina	Ratón	BD Biosciences	1:2000	
Receptor P2Y ₁	Conejo	Alomone Labs	1:200	1:100
Receptor P2Y ₁₂	Conejo	Alomone Labs	1:200	1:100
Receptor P2Y ₁₃	Conejo	Alomone Labs	1:200	1:100

Para la titulación de los lentivirus, las células HEK293T se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos pretratados con poli-D-lys, a una densidad de 75.000 células/pocillo. A las 16 h se infectaron con el vector lentiviral pWPXL-M1 en 250 µl de DMEM 2% FBS, y 24 h más tarde se añadieron 750 µl más de DMEM 2% FBS. Después de 48 h se realizó la inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-receptor M1.

Para las inmunofluorescencias en secciones de tejido, las secciones se lavaron cuatro veces durante 5 min con TBS (100 mM Tris y 225 mM NaCl) y los antígenos se desenmascararon mediante incubación de 20 min con tampón 10 mM citrato sódico pH 6 a 90°C. Después se trataron durante 3 h con solución de bloqueo (10% suero de cabra, 0,3% Tritón X-100 en TBS) y se incubaron con los anticuerpos primarios durante 48 h a 4°C. Tras dos lavados de 5 min en TBS las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos Alexa, diluidos 1/100, durante 2 h a 4°C. Se eliminó el exceso de anticuerpo con dos lavados más de 5 min y los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar y se deshidrataron tratándolos durante 30 seg en etanol 80°, 30 seg en etanol 90°, 30 seg en etanol 100° y durante 1 h en xilol. Finalmente, los portaobjetos se dejaron secar al menos 24 h antes de retirar el exceso de montador. Todos los anticuerpos se diluyeron en 1% suero de cabra o conejo y 0,3% Tritón X-100 en TBS.

Tabla 4. Anticuerpos secundarios conjugados usados para *immunoblot* (IB) e inmunofluorescencia (IF).

Anticuerpo	Especie	Proveedor	Dilución	
			IB	IF
IgG de conejo conjugado con peroxidasa (HRP)	Burro	Amersham	1:10.000	
IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP)	Oveja	Amersham	1:10.000	
IgG de cabra conjugado con peroxidasa (HRP)	Burro	Santa Cruz Biotechnology	1:10.000	
IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor-488 (verde)	Cabra	Molecular Probes		1:200
IgG de ratón conjugado con Alexa-Fluor 488 (verde)	Cabra	Molecular Probes		1:200
IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor-546 (rojo)	Cabra	Molecular Probes		1:200
IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Burro	Jackson ImmunoResearch Laboratories		1:200

3.8. ENSAYO DE UNIÓN DE [³H]-ESCOPOLAMINA.

Las células PC12 o PC12M1 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 75.000 células/pocillo, y se dejaron crecer durante 48 h. La unión de [³H]-escopolamina se determinó incubando las células con 3 nM de cloruro de metilo de 1-[³H-N-metil]-escopolamina (81 Ci/ mmol; Amersham International) durante 2 h a 4°C. La unión no específica se calculó de células incubadas en paralelo con 3 nM de [³H]-escopolamina más 300 nM de escopolamina no radiactiva. La unión específica se desplazó preincubando las células con atropina (10 µM) durante 15 min antes de empezar el ensayo. Las reacciones de unión se finalizaron lavando tres veces con medio a 4°C. La [³H]-escopolamina se extrajo solubilizando las células con 500 µl de NaOH 0,5 M durante 1 h y la cantidad de [³H]-escopolamina unida se normalizó con el número de células en placas sembradas por duplicado.

3.9. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO.

3.9.1. Northern Blot.

Las células PC12 o PC12M1 se sembraron en placas de 60 mm de diámetro (500.000 células/placa) y se mantuvieron en medio con 0,25% de suero durante las 16 h anteriores a las estimulaciones. Tras los tratamientos, se retiró el medio y se añadió 1 ml del reactivo TRIzol (Invitrogen) por cada placa para extraer el ARN total. La cantidad de ARN total obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. Se corrieron 20 µg de ARN desnaturalizado total en geles de agarosa al 1% y formaldehído 2,2 M, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Un fragmento de 200 pares de bases de ADNc de la HO-1 de rata se marcó con [³²P]-ATP (2000 Ci/mmol; Amersham International), obteniéndose una actividad específica de 109 cpm/ng y se usó para su hibridación a una concentración de 10 ng/ml.

3.9.2. PCR semicuantitativa y a tiempo real.

Las células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro (500.000 células/placa) y se mantuvieron en medio con 0,25% de suero durante las 16 h anteriores a las estimulaciones. En el caso de las NGCs, las células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro a una densidad de 500.000 células/ml (2 millones células/placa). A los 10 DIV se pusieron los tratamientos correspondientes.

Tras los tratamientos, se retiró el medio y se añadió 1 ml del reactivo TRIzol (Invitrogen) por cada placa para extraer el ARN total. La cantidad de ARN total obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop). 1 µg de ARN de los distintos tratamientos se retrotranscribió a ADN copia durante 75 min a 42 °C usando 5 unidades de la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega) en presencia de 20 unidades de RNasín (Promega), 1 µl OligodT (Invitrogen), 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP's (Applied Biosystems) y thermobuffer 10X de Promega. La amplificación del ADN copia por PCR semicuantitativa se llevó a cabo en presencia de 0,6

unidades de la GoTaq ADN polimerasa, 5 mM MgCl₂, 2 mM dNTP's, tampón verde 5X de la GoTaq ADN polimerasa (Promega) y 30 µM de cada cebador para cada gen específico. Para normalizar se amplificó el gen ubicuo de la subunidad 18S del ribosoma o el de la β-actina. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de *n* ciclos de desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, anillamiento a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos (siendo *n* el número óptimo de ciclos para una amplificación en rango lineal). La tabla 5 muestra los cebadores directos y reversos que usaron para cada gen analizado, el tamaño del fragmento esperado y el número de ciclos para la amplificación en un rango lineal. Los productos de las PCRs se corrieron en geles de acrilamida/bisacrilamida al 5% y se tiñeron durante 25 min con Syber Safe (Invitrogen).

Tabla 5. Cebadores directos y reversos utilizados en las PCR semicuantitativas.

Gen amplificado	Cebador directo	Cebador reverso	Tamaño fragmento (pb)	Número de ciclos
HO-1	5'-CGTGCTCGCA-TGAACACTCT-3'	5'-GGCGGTCTTA-GCCTCTTCTGT-3'	72	30-32
18S	5'-CACGGCCGGT-ACAGTGAAA-3'	5'-AGAGGAGCGA-GCGACCAA-3'	59	28-30
β-actina	5'-AACCCCTAAGG-CCAACCGTGAAAAG-3'	5'-CGACCAGAGG-CATACAGGGACAAC-3'	110	22-24
P2Y ₁ R	5'-CAGCAGTTTC-CTCTTCATTC-3'	5'-CAGAGCCAAA-TTGAACATGT-3'	150	28-30
P2Y ₁₃ R	5'-GGTGCCCCAG-GGACACTC-3'	5'-CATTATCAAG-TCTGCCAC-3'	150	28-30

En el caso de las PCRs cuantitativas, el ADN copia se sintetizó como se ha descrito anteriormente, utilizando cantidades similares de ARN. La reacción se llevó a cabo en 25 µl utilizando la sonda fluorescente SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) y una mezcla de 5 µM de los cebadores directos y reversos. La cuantificación se llevó a cabo en un termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización durante 15 segundos a 95°C, y anillamiento y extensión a 60°C durante 30 segundos. Los cebadores utilizados fueron los mismos que para las PCRs semicuantitativas. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron con el programa *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) por el método de la cuantificación relativa por comparación de *C_T* (*threshold cycle*, umbral de

detección establecido). En este método se calcula la media de los triplicados, y los niveles de expresión del gen de interés se normalizan por la media de los triplicados del gen constitutivo utilizado (18S o β -actina) en la misma muestra. A continuación, la cantidad de ARNm del gen de interés de una muestra determinada (m) se expresa en relación a los niveles de dicho ARNm en una muestra control (c). Así, la cantidad relativa de un gen de interés en una muestra m es igual a $2^{-\Delta\Delta C_T}$, donde $\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_m - (\Delta C_T)_c$, siendo $\Delta C_T = C_T$ gen interés - ΔC_T gen constitutivo.

3.10. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.

3.10.1. Ensayo colorimétrico MTT.

El método MTT se realizó utilizando un kit de la casa comercial Sigma Aldrich. Este método se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de romper el anillo de tetrazolio del componente clave del kit, el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio (MTT, que en disolución es amarillo), liberando cristales insolubles de formazán, de color morado (Fig 10). Estos cristales de formazán pueden solubilizarse en isopropanol y medirse en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Cuanto mayor sea el número de células vivas presentes, mayor cantidad de cristales de formazán se formarán y mayor será la absorbancia de la muestra.

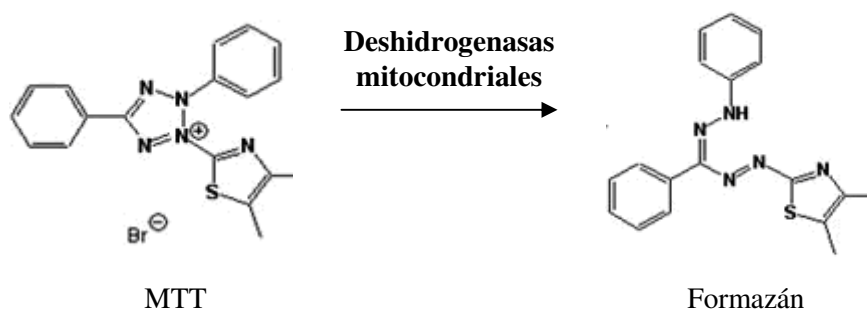


Figura 10. Reducción de MTT por deshidrogenasas mitocondriales.

Las NGCs se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 500.000 células/pocillo y a los 10 DIV se realizó el ensayo. Tras la incubación de las células con los estímulos tóxicos, se les retiró el medio y se les añadió tampón Locke (NaCl 140 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, glucosa 5,5 mM y HEPES 10 mM; pH 7,4) al que se le había añadido solución reconstituida de MTT a una concentración de 1,2 μ M, manteniéndose en incubación a 37°C durante 2-3 h. Tras este paso se añadió tampón de solubilización (10% Tritón X-100, 10% HCl 1N, 80% isopropanol) en volumen igual al que teníamos en el pocillo, agitando la placa durante 30-60 min, en un agitador orbital, hasta que el formazán se solubilizó completamente. Finalmente se rasparon los pocillos para homogeneizar toda la mezcla y se midió la longitud de onda a 570 nm con ayuda de un espectrofotómetro. Como blanco se empleó una solución de MTT reconstituido en ausencia de células y mezclado con el tampón de solubilización. Los datos de absorbancia obtenidos de las muestras control, que no habían sido sometidas a ningún tratamiento, se ajustaron como referencia al 100% de

supervivencia, calculando así el porcentaje de viabilidad de las células presentes en los pocillos a los que se les había añadido los diferentes tratamientos. Los ensayos de MTT se realizaron por triplicado, utilizando 3-4 pocillos para cada condición experimental.

3.10.2. Ensayo fluorescente de ioduro de propidio.

El ioduro de propidio (IP) es un marcador fluorescente que entra en la células muertas, uniéndose al ADN y emitiendo fluorescencia tras su unión a la cromatina. Las NGCs se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 500.000 células/pocillo y a los 10 DIV se realizó el ensayo. Tras la incubación de las células con los estímulos tóxicos, se lavaron una vez con PBS1X a 37°C y se incubaron con 5 µM IP (Sigma Aldrich) y 100 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) durante 20 minutos en oscuridad y agitación a 25°C. Después se lavaron dos veces con PBS1X a 4°C y se tomaron imágenes con un microscopio invertido *Axiovert 35* (Nikon Co.) con filtro de excitación de 530 nm y de emisión de 580 nm para el IP, y filtro de excitación de 340 nm y de emisión de 460 nm para el Hoechst33342. Los ensayos de ioduro de propidio se realizaron por triplicado, utilizando 3-4 pocillos para cada condición experimental. Se tomaron tres fotografías de cada pocillo y se cuantificó la intensidad de fluorescencia empleando el programa *NIS Elements 3.0* (Nikon Co.).

3.10.3. Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

La LDH es una enzima citoplasmática muy estable presente en todas las células. Se libera rápidamente al medio de cultivo cuando existe un daño en la membrana plasmática. La actividad lactato deshidrogenasa (LDH) extracelular vs la total (intracelular y extracelular) se determinó utilizando un kit de la casa comercial Roche Applied Science, según las instrucciones del fabricante. La actividad LDH se determina mediante un test enzimático: en el primer paso, el NAD^+ se reduce a NADH/H^+ por la reacción de conversión de lactato a piruvato catalizada por la LDH. En el segundo paso, el catalizador (diaforasa) transfiere los H/H^+ del NADH/H^+ a la sal de tetrazolio, que se reduce a formazán (Fig 11). Un incremento en la cantidad de muerte celular o de células que tienen dañada su membrana plasmática implica un incremento en los niveles de LDH en el medio de cultivo. Este incremento en la cantidad de enzima en el sobrenadante correlaciona con la cantidad de formazán que se forma. Por tanto, la cantidad de color rojo que se forma en el ensayo es proporcional al número de células lisadas. El formazán es soluble en agua y muestra un máximo pico de absorción a 500 nm, mientras que la sal de tetrazolio no muestra absorbancia a esta longitud de onda.

Las células PC12 o PC12M1 se sembraron en placas de 24 pocillos (75.000 células/pocillo) y a las 24 h se incubaron con H_2O_2 durante 6 h. La producción de formazán se midió por espectrofotometría a 490 nm.

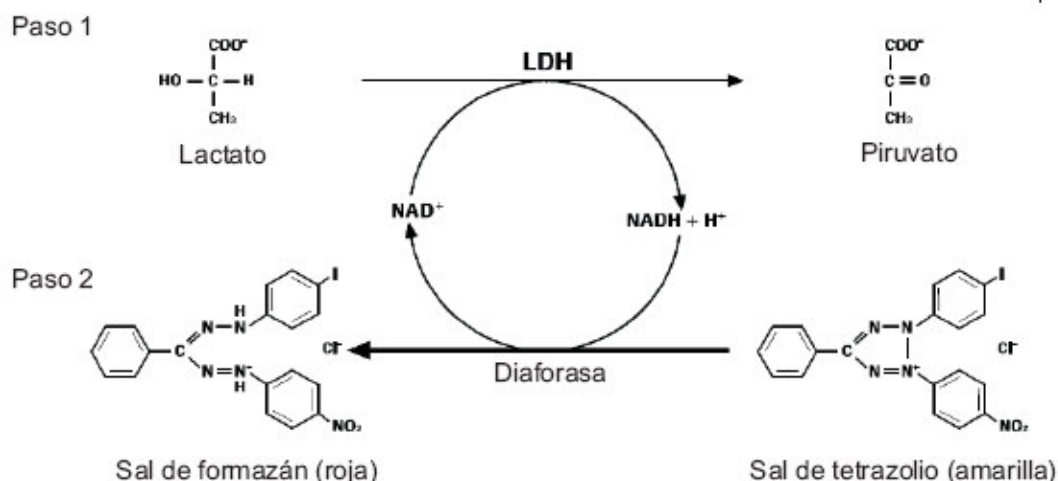


Figura 11. Fundamento para la determinación de LDH utilizando el kit de Roche Applied Science.

3.11. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).

Para determinar la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) se utilizó la sonda 5-(y 6-) diacetato de carboxi- 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (Carboxi-H₂DCFDA). La carboxi-H₂DCFDA se desacetila por esterasas citosólicas y al ser oxidada por diversas ROS da como resultado un compuesto fluorescente de color verde brillante llamado 5-(y 6-) carboxi- 2',7'-diclorofluoresceína (Carboxi-DCF), el cual permanece en el citosol (Fig 12).

Las NGCs se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 500.000 células/pocillo y a los 10 DIV se realizó el ensayo. Tras la incubación de las células con los estímulos tóxicos, se lavaron una vez con PBS1X a 37°C y se incubaron con 1 μM de carboxi-H₂DCFDA durante 20 minutos en oscuridad y agitación a 25°C. Después se lavaron dos veces con PBS1X a 4°C y se tomaron imágenes con un microscopio invertido *Axiovert 35* (Nikon Co.) con filtro de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm. Los ensayos de determinación de ROS se realizaron por triplicado, utilizando 3-4 pocillos para cada condición experimental. Se tomaron tres fotografías de cada pocillo y se cuantificó la intensidad de fluorescencia empleando el programa *NIS Elements 3.0* (Nikon Co.). Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia con respecto al H₂O₂, normalizando a una unidad.

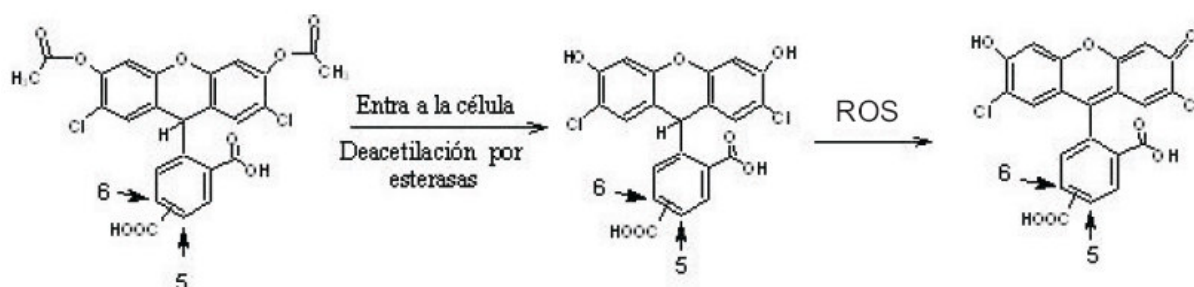


Figura 12. Oxidación de carboxi-H₂DCFDA a Carboxi-DCF.

3.12. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH).

Para la determinación de los niveles intracelulares de GSH se empleó la sonda fluorescente sensible a GSH, monoclorobimano. Esta sonda forma un aducto con la molécula de GSH mediante una reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa.

Las NGCs se sembraron en placas de 60 mm de diámetro a una densidad de 500.000 células/ml (2 millones células/placa) y a los 10 DIV se pusieron los tratamientos correspondientes. Tras los tratamientos, las células se lavaron una vez con PBS1X frío y se lisaron en hielo con ayuda de un raspador con 200 µl de tampón Krebs-Henseleit pH 7,4 con 0.1% Tritón X-100 (142 mM NaCl, 23,8 mM NaHCO₃, 4,83 mM KCl, 0,96 mM KH₂PO₄, 1,20 mM MgSO₄, 12,5 mM HEPES, 5 mM glucosa y 1,53 mM CaCl₂). Los lisados se sonicaron, se centrifugaron a 18220 $\times g$ durante 15 min y los sobrenadantes se usaron para medir los niveles de GSH (Kannan *et al.*, 1993). Los niveles de GSH se determinaron tras la incubación durante 30 min con la sonda fluorescente monoclorobimano (Fluka) y 1 U/ml de glutatión-S-transferasa (Sigma Aldrich) utilizando un lector de placas *Synergy HT multi-mode* (Biotek Instruments Inc.) (filtro de excitación de 385 nm y filtro de emisión de 478 nm). Los ensayos de determinación de GSH se realizaron por triplicado. La fluorescencia basal se determinó de las células que no se incubaron con la sonda y fue sustraída a todas las muestras.

3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis paramétrico cuantitativo de los datos experimentales y su significación estadística se realizó sometiendo la media control y la media problema a una prueba *t de student*, empleando el programa de análisis estadístico Origin 6.0. Salvo que se indique lo contrario, el tamaño muestral=3, considerándose significativa una $p<0,05$.

RESULTADOS

4.1. REGULACIÓN DEL EJE NRF2/HO-1 POR EL RECEPTOR MUSCARÍNICO M1.

4.1.1. Los agonistas colinérgicos inducen la expresión de HO-1 en cultivos primarios de neuronas que expresan el receptor muscarínico M1.

Primero analizamos el efecto del agonista de la acetilcolina, carbacol (Cch), en la expresión de la enzima antioxidante HO-1 en cultivos primarios de neuronas de hipocampo y de cerebelo (NGCs), que expresan el receptor muscarínico M1. La incubación con Cch (1 mM, 6 h) indujo un incremento en los niveles de HO-1 de tres veces tanto en neuronas de hipocampo (Figs 13a y 13c) como en NGCs (Figs 13b y 13c). También comparamos el efecto del Cch con otro agonista colinérgico específico de receptores muscarínicos, la pilocarpina (PC), y con un antagonista selectivo del receptor M1, la dicitlomina (DCC), en NGCs (Fig 13d). Tanto el Cch como la PC incrementaron los niveles de HO-1, pero cuando las neuronas se preincubaron con DCC (10 μ M), y posteriormente se co-incubaron con PC (1 mM) durante 6 h, se redujo drásticamente la inducción de HO-1 (Fig 13d).

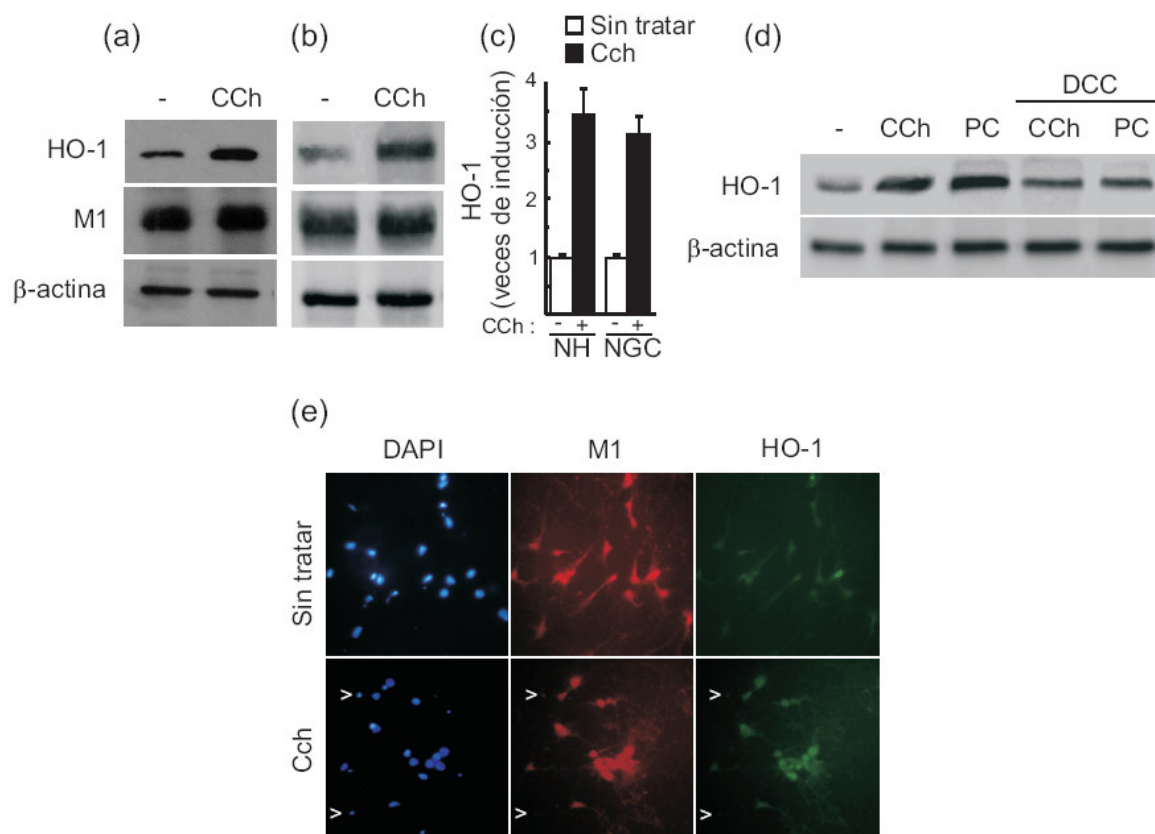


Figura 13. Los agonistas colinérgicos inducen HO-1 en cultivos primarios de neuronas de rata. (a) y (b) *Inmunoblots* de cultivos primarios de neuronas de hipocampo (NH) (a) y de neuronas granulares de cerebelo (NGC) (b) incubados con 1 mM de Cch durante 6 h. Paneles superiores: anti-HO-1, paneles medios: anti-M1, paneles inferiores: anti β -actina. (c) Análisis densitométrico de tres experimentos similares mostrando el incremento en los niveles de HO-1 en ambos tipos de neuronas. Los niveles de HO-1 se normalizaron con los de la β -actina. (d) *Inmunoblots* de NGCs incubadas durante 6 h con CCh (1 mM), PC (1 mM) o DCC (10 μ M). La DCC se añadió 10 min antes de la PC o el CCh. Paneles superiores: anti-HO-1, paneles medios: anti-M1, paneles inferiores: anti β -actina. (e) Inmunofluorescencia en neuronas de hipocampo incubadas con Cch durante 6 h. Azul: núcleos teñidos con DAPI; rojo: receptor M1, verde: HO-1. Las flechas señalan células que no expresan el receptor M1 y que no presentan un incremento en HO-1 en respuesta a Cch.

Una evidencia adicional de la inducción de HO-1 por el Cch se obtuvo mediante inmunofluorescencia en cultivos primarios de neuronas de hipocampo tratadas con Cch durante 16 h (Fig 13e). Como la inducción de HO-1 por el Cch tuvo lugar en neuronas que expresan el receptor muscarínico M1, nos planteamos la posibilidad de que este receptor pudiera activar una cascada de señalización que llevara a inducir una respuesta antioxidante celular.

4.1.2. Expresión ectópica del receptor M1 funcional en células PC12.

Las células PC12 que expresan el receptor muscarínico M1 (desde ahora PC12M1) se generaron mediante infección con el vector lentiviral pWPXL-M1. Como se muestra en la figura 14a, el receptor M1 apenas se detectó en células PC12 control. Sin embargo, 48 h después de la infección con el vector pWPXL-M1, observamos un incremento del receptor de 6,2 veces. Además, el análisis de sitios de unión de alta afinidad del agonista muscarínico [3 H]-escopolamina (3 nM) mostró un incremento de cuatro veces en el número de sitios de unión de alta afinidad, que se eliminaron por incubación durante 15 min con un exceso de 100 veces de escopolamina no radiactiva o con el antagonista muscarínico atropina (Fig 14b).

La titulación de los lentivirus reveló que aproximadamente un 85% de células PC12M1 se tiñeron con el anticuerpo anti-M1 (Fig 14c). Las células PC12 control, infectadas con vector lentiviral vacío (pWPXL) no se tiñeron con este anticuerpo.

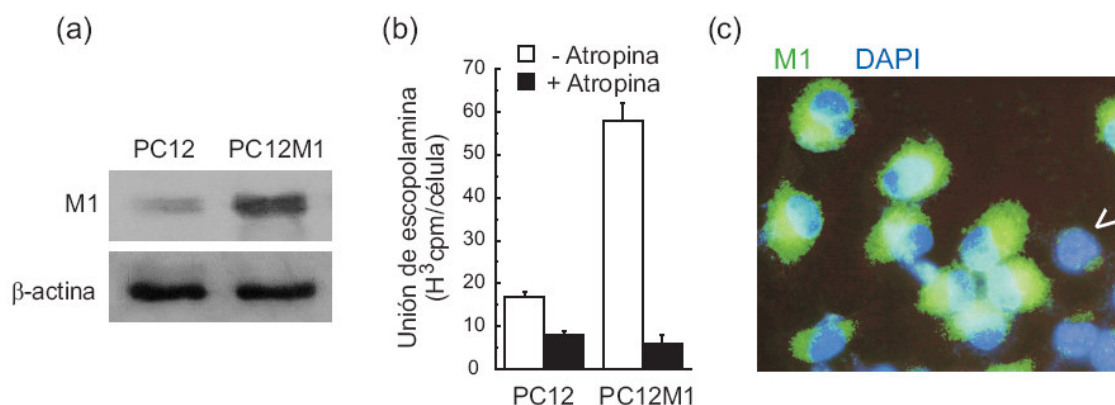


Figura 14. Sobre-expresión del receptor M1 en células PC12. (a) *Inmunoblot* mostrando el receptor M1 en células PC12 y PC12M1. Panel superior: anti-M1, panel inferior: anti β -actina. El análisis por densitometría de tres experimentos similares indicó un incremento de 6,2 veces \pm 0,4 en los niveles del receptor M1 después de la normalización con la β -actina. (b) Comparación de sitios de unión de alta afinidad para el agonista muscarínico escopolamina en células PC12 y PC12M1. Cada valor es la media de seis muestras \pm D.E. (c) Inmunofluorescencia de células PC12M1 hibridadas contra el receptor M1 (verde) y posteriormente teñidas con DAPI (azul). Las flechas señalan una célula que no expresa el receptor M1 y sirve de control negativo.

4.1.3. La activación del receptor M1 induce la expresión de HO-1.

Las células PC12 y PC12M1 se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero durante 16 h y posteriormente se incubaron con el inductor de HO-1, hemina (50 μ M) y con distintas concentraciones de Cch, desde 0,03 hasta 1 mM, durante 6 h, como se indica en las figuras 15a y 15b. Las células PC12 presentaron un incremento en los niveles de HO-1 en respuesta a la hemina, pero apenas

respondieron al Cch (alrededor de 1,5 veces de inducción sobre las células PC12 no estimuladas), sugiriendo que los receptores colinérgicos endógenos no inducen HO-1 o se expresan en cantidades tan bajas que no dan lugar a una respuesta significativa. Por el contrario, las células PC12M1 presentaron un incremento significativo en los niveles de HO-1 tras 6 h de tratamiento con Cch y alcanzaron una máxima inducción a concentraciones por encima de 0,1 mM. Como no hubo signos de toxicidad a ninguna de las concentraciones de Cch utilizadas, elegimos la dosis de 1 mM en los siguientes experimentos para asegurar una respuesta óptima.

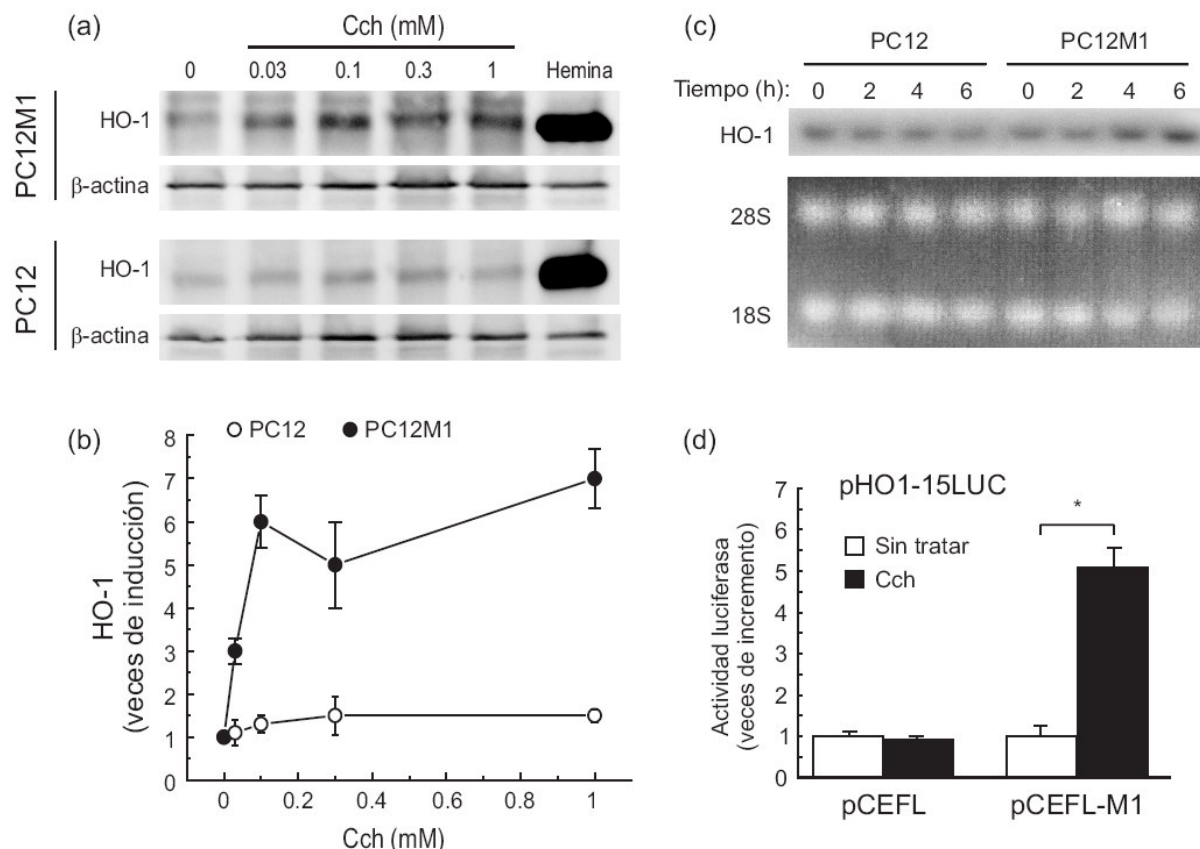


Figura 15. El receptor M1 induce la expresión de HO-1. (a) Niveles de HO-1 en células PC12 y PC12M1 tratadas con las concentraciones indicadas de Cch o con 50 μ M de hemina durante 6 h. Paneles superiores: anti-HO-1, paneles inferiores: anti β -actina, mostrando una carga similar de proteína en cada calle. (b) Cuantificación por densitometría de (a). Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. (c) Análisis mediante Northern Blot de los niveles de ARNm de la HO-1 en células PC12 y PC12M1 tratadas con 1 mM de Cch durante los tiempos indicados. Panel superior: autorradiograma mostrando el ARNm de la HO-1, panel inferior: gel teñido con bromuro de etidio utilizado para hibridar el panel superior, mostrando una cantidad similar de ARN en cada calle. (d) Ensayo de luciferasa mostrando que la expresión del gen *Hmox1* es dependiente de M1. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de pHO1-15LUC (o pGL3basic como control) y con 700 ng de vector control (pCEFL) o pCEFL-M1, como se indica. Después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero y se incubaron con Cch (1 mM) durante 16 h. Los ensayos de luciferasa se hicieron al menos 3 veces utilizando 3-4 muestras para cada condición experimental. Los valores de la gráfica corresponden a la media \pm D.E. Se aplicó el test *t de student* para analizar las diferencias entre los grupos. El asterisco muestra diferencias significativas con una $p < 0,05$.

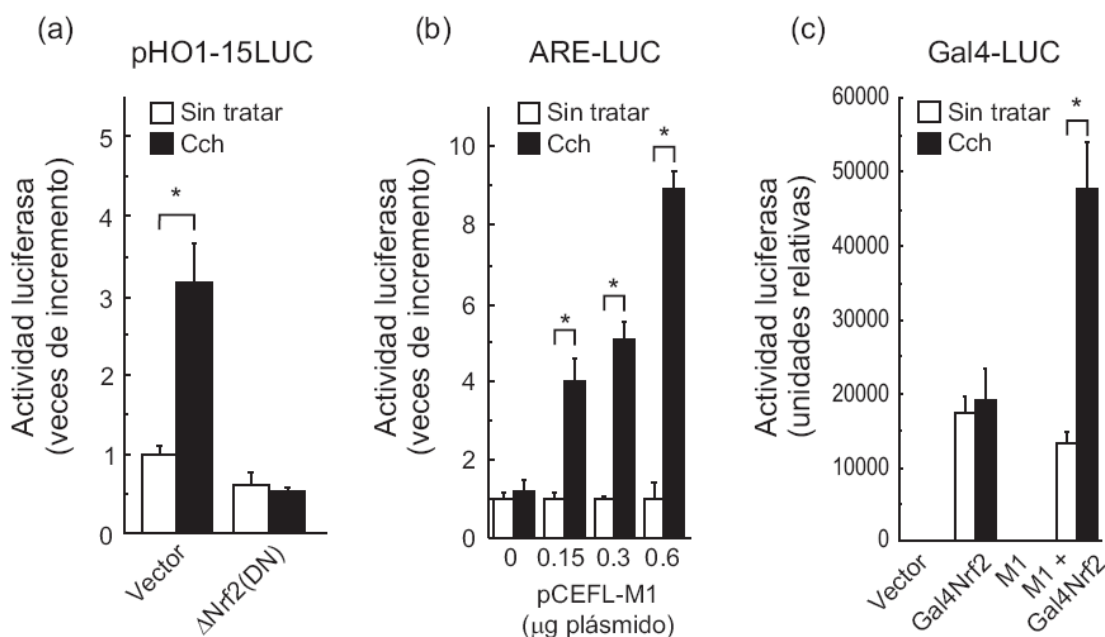
Determinamos también los niveles de ARN mensajero (ARNm) en respuesta al Cch. Como se muestra en la figura 15c, los niveles de ARNm de la HO-1 no cambiaron significativamente en células PC12. Por el contrario, en células PC12M1 los niveles de ARNm se incrementaron tras 4 y 6 h de

incubación con Cch. También analizamos el efecto de la activación del receptor M1 sobre la expresión de HO-1 utilizando el plásmido reportero de luciferasa pHO1-15LUC, y el plásmido sin promotor pGL3basic como control. Las células PC12 se transfectaron con el plásmido pHO1-15LUC y un vector de expresión para M1 (pCEFL-M1). Después de la transfección, las células se mantuvieron en medio sin suero durante 16 h en presencia o ausencia de Cch. Como se muestra en la figura 15e, las células PC12 transfectadas con vector vacío (pCEFL) no respondieron al Cch. Por el contrario, las células transfectadas con el vector pCEFL-M1 presentaron un incremento en la actividad luciferasa en presencia de Cch. Todos estos resultados indican que el Cch utiliza el receptor M1 para inducir la expresión de HO-1.

4.1.4. La inducción de HO-1 por el receptor M1 es dependiente de la actividad transcripcional de Nrf2.

Nrf2 es un factor de transcripción crucial para la regulación de la homeostasis redox celular, así que quisimos analizar si Nrf2 es diana de M1. Como se muestra en la figura 16a, la activación del reportero pHO1-15LUC por el receptor M1 se bloqueó sustancialmente en presencia del mutante dominante negativo Δ Nrf2(DN), que carece del dominio de transactivación.

Como los AREs son diana de Nrf2, analizamos si el receptor M1 podría estar induciendo una vía de señalización implicada en regulación de dichos elementos. Para ello utilizamos un plásmido reportero de luciferasa que contiene tres secuencias ARE del gen *Hmox1* murino colocadas en tándem, llamado ARE-LUC. Las células PC12 se transfectaron con ARE-LUC y con diferentes cantidades del receptor M1 como se indica en la figura 16b. Después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero en presencia o ausencia de 1 mM de Cch durante 16 h. Como se muestra en la figura 16b, el Cch activó al reportero ARE-LUC en células que expresan el receptor M1.



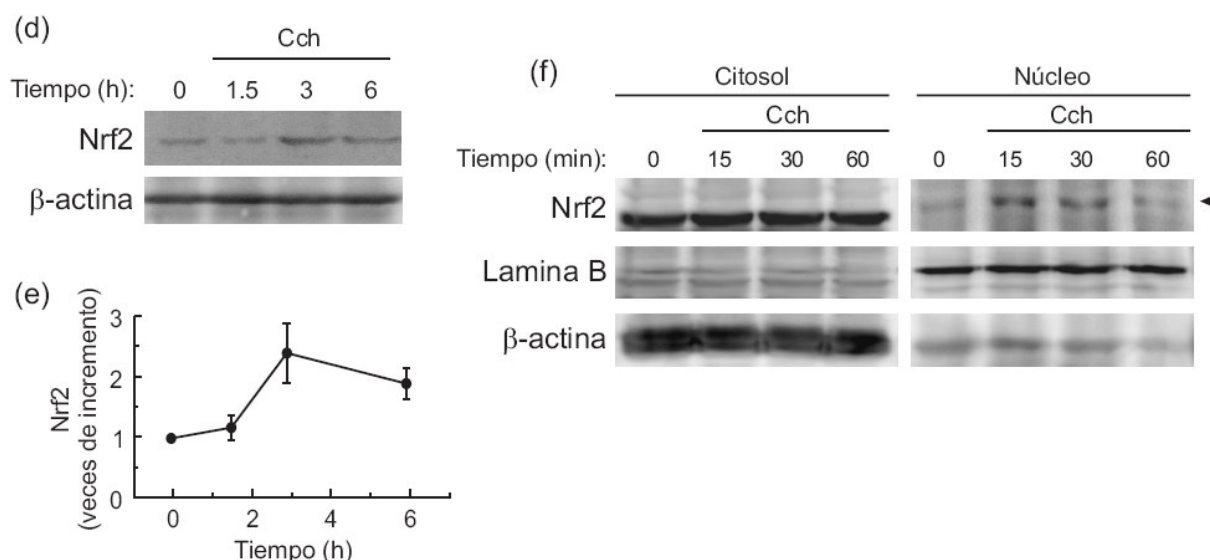


Figura 16. El receptor M1 activa a Nrf2 e induce una respuesta antioxidante. (a) M1 necesita a Nrf2 para activar el promotor de la HO-1. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de pHO1-15LUC (o pGL3basic como control), 500 ng de pCEFL-M1 y 400 ng de vector control o pEF Δ Nrf2(DN), como se indica. (b) El receptor M1 activa los AREs. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng del plásmido ARE-LUC (o pGL3basic como control) y con diferentes cantidades del vector pCEFL-M1. (c) M1 utiliza la actividad transactivadora de Nrf2 para inducir los AREs. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng del plásmido Gal4-LUC y con cantidades hasta 1200 ng de vector de expresión vacío o de vectores de expresión para Gal4Nrf2, M1 y Gal4Nrf2+M1, como se indica. Para (a-c), después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero y se incubaron con Cch (1 mM) durante 16 h. (d y e) La activación del receptor M1 resulta en un incremento de los niveles de Nrf2. Las células PC12M1 se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero durante 16 h y posteriormente se les retiró el suero y se incubaron con 1 mM de Cch durante los tiempos indicados. (d) Panel superior: anti-Nrf2. Panel inferior: anti- β -actina. (e) Cuantificación por densitometría de (d). Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. (f) El Cch induce la translocación nuclear de Nrf2. Las células PC12M1 se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero durante 16 h y posteriormente se les retiró el suero y se incubaron con 1 mM de Cch durante los tiempos indicados. Panel superior: anti-Nrf2. Panel medio: anti-lamina B, mostrando los extractos nucleares. Panel inferior: anti- β -actina, mostrando los extractos citosólicos.

Para estudiar la regulación de Nrf2 por el receptor M1 en ausencia de otros elementos que pudieran estar implicados en la regulación de los AREs, utilizamos un vector de expresión para una proteína de fusión que contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 de levaduras y el dominio de transactivación de Nrf2 (Gal4-Nrf2). Las células PC12 se transfectaron con vector vacío o con vector de expresión para M1 más Gal4-Nrf2 y el plásmido reportero Gal4-LUC como se indica en la figura 16c. Las células transfectadas con Gal4-LUC y con Gal4-Nrf2 presentaron un gran incremento en la actividad luciferasa comparado con las células transfectadas con Gal4-LUC y vector vacío. Además, cuando las células PC12 transfectadas con M1 se transfectaron con los mismos plásmidos y se estimularon con Cch, observamos un incremento en la actividad luciferasa de casi cuatro veces.

Después analizamos los niveles totales de Nrf2 en presencia de Cch. Las células PC12M1 se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero durante 16 h y posteriormente se les retiró el suero y se incubaron con 1 mM de Cch. Como se muestra en las figuras 16d y 16e, el Cch produjo un modesto

incremento en los niveles de Nrf2 que fue máximo entre 3 y 6 h, sugiriendo que la activación del receptor M1 lleva a la estabilización de este factor de transcripción. Además, como se muestra en la figura 16f, el Cch indujo una acumulación nuclear de Nrf2 tras 15 y 30 min de incubación. Todos estos resultados indican que Nrf2 es diana del receptor M1 en la activación de los AREs.

4.1.5. El receptor muscarínico M1 utiliza $G\alpha_q$ para inducir los AREs.

Para diseccionar la vía de señalización que lleva a la activación de los AREs, analizamos el efecto del Cch en células PC12 co-transfectadas con la región carboxiterminal de $G\alpha_q$ ($G\alpha_q$ -Ct), que actúa como dominante negativo en la función de esta proteína (Arai *et al.* 2003), y con el vector de expresión para M1. Como se muestra en la figura 17a, el Cch incrementó la expresión de los AREs en aproximadamente 5 veces, mientras que las células transfectadas con $G\alpha_q$ -Ct presentaron una reducción drástica de esa inducción.

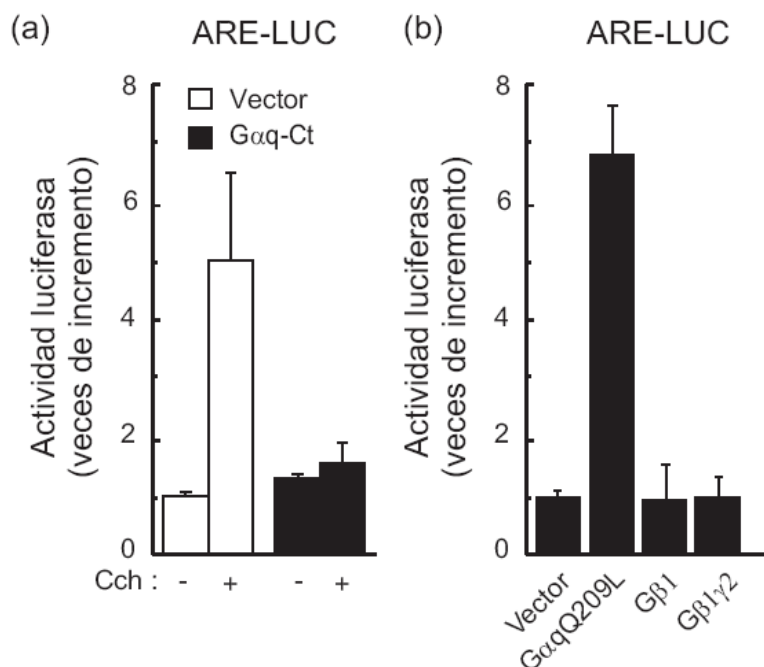


Figura 17. El receptor M1 utiliza $G\alpha_q$ pero no $G\beta\gamma$ para activar los AREs. (a) El mutante dominante negativo de $G\alpha_q$ ($G\alpha_q$ -Ct) impide la señalización desde M1 a los AREs. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control), 500 ng de pCEFL-M1 y 300 ng de vector vacío (pCDNA3.1) o de pCDNA3.1- $G\alpha_q$ -Ct, como se indica. Después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero y se incubaron con Cch (1 mM) durante 16 h. (b) $G\alpha_q$ pero no $G\beta\gamma$ inducen los AREs. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control) y con cantidades hasta 700 ng de vectores de expresión para $G\alpha_q$ Q209L, $G\beta 1$ o $G\gamma 2$, como se indica. Después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero durante 16 h y se analizó la actividad luciferasa.

En experimentos adicionales analizamos el efecto del mutante constitutivamente activo $G\alpha_q$ Q209L, este mutante envía una respuesta efectora en ausencia de estimulación del receptor, ya que carece de actividad GTPásica (De Vivo *et al.* 1992; Neves *et al.* 2002). También analizamos el efecto de las subunidades β y $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas, que activan sus propias vías de señalización. Los ensayos de luciferasa se hicieron en células PC12 transfectadas con ARE-LUC y con

vectores de expresión para estas subunidades. Como se muestra en la figura 17b, las subunidades G β o G $\beta\gamma$ no activaron los AREs. Por el contrario, G α qQ209L produjo una activación potente de los AREs por sí misma. Estos resultados indican que G α q es necesaria y suficiente para la señalización desde el receptor M1 hasta los AREs.

4.1.6. G α q induce los AREs a través de la activación de la fosfolipasa C- β (PLC- β) y la proteína quinasa C- γ (PKC- γ).

Para analizar la vía de señalización que conecta G α q con Nrf2 utilizamos primero un inhibidor selectivo de la familia de proteínas quinasas C (PKCs), la queleritrina, y un bloqueante de los canales de calcio de la membrana plasmática, el 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB), que bloquea la acción de las PKCs dependientes de calcio (α , β , γ). Las células PC12 se transfectaron con el plásmido ARE-LUC y con el vector de expresión para M1 (pCEFL-M1) o para G α qQ209L (pCDNA3.1.G α qQ209L). Después de la transfección, las células se mantuvieron en medio sin suero durante 16 h en presencia o ausencia de Cch (1 mM), queleritrina (0,5, 1 y 2 μ M) o 2-APB (50, 100 y 200 μ M), como se indica en las figuras 18a y 18b. Ambos inhibidores, que tienen diferentes mecanismos de acción, bloquearon la activación de los AREs de manera dosis-dependiente a través del receptor M1 o de G α qQ209L. Estos experimentos demuestran un papel de las PKCs clásicas como mediadores de la activación de los AREs por el receptor M1.

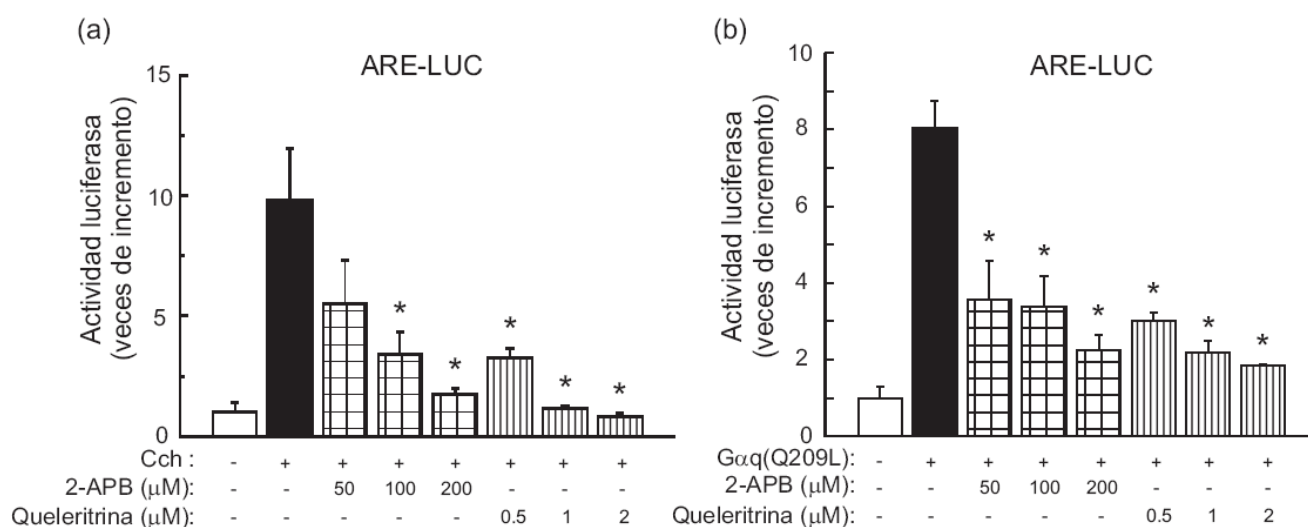


Figura 18. El receptor M1 utiliza la PKC para activar los AREs. (a) La inhibición de la señalización por PKC inhibe la inducción de los AREs a través del receptor M1. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control) y con 700 ng del vector de expresión para M1 (pCEFL-M1). (b) La inhibición de la señalización por PKC inhibe la inducción de los AREs a través de G α qQ209L. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control) y con 700 ng del vector de expresión para G α qQ209L (pCDNA3.1.G α qQ209L). Para (a y b), después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero y se incubaron con el inhibidor de las PKCs, queleritrina (0,5, 1 y 2 μ M), o con el inhibidor de las PKCs dependientes de calcio, 2-APB (50, 100 y 200 μ M), durante 16 h. El Cch (1 mM) se añadió 30 min después de la queleritrina o el 2-APB. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre el grupo sin tratar y cada uno de los grupos tratados con queleritrina o 2-APB.

Para determinar el papel de las PKCs clásicas como mediadores de la respuesta elegimos la isoforma PKC- γ , ya que el receptor M1 y la PKC- γ son abundantes en el hipocampo y co-localizan en neuronas de hipocampo (Tang *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2005) (Fig 19a). Analizamos la activación del ARE-LUC en células que sobre-expresan G α qQ209L y PLC- β , PKC- γ o ambas. Para este experimento utilizamos una cantidad de G α qQ209L menor que en las figuras 17b y 18b para evitar la saturación (dos veces de incremento v.s. casi 8 veces de incremento). Como se muestra en la figura 19b, la PLC- β y la PKC- γ cooperaron con G α qQ209L para activar los AREs, pero la inducción mayor se observó cuando se transfectaron G α qQ209L, PLC- β y PKC- γ juntas. Por lo tanto, ambos enfoques, el farmacológico y el genético, determinaron que el eje G α q/PLC- β /PKC- γ llevaba a la activación de los AREs.

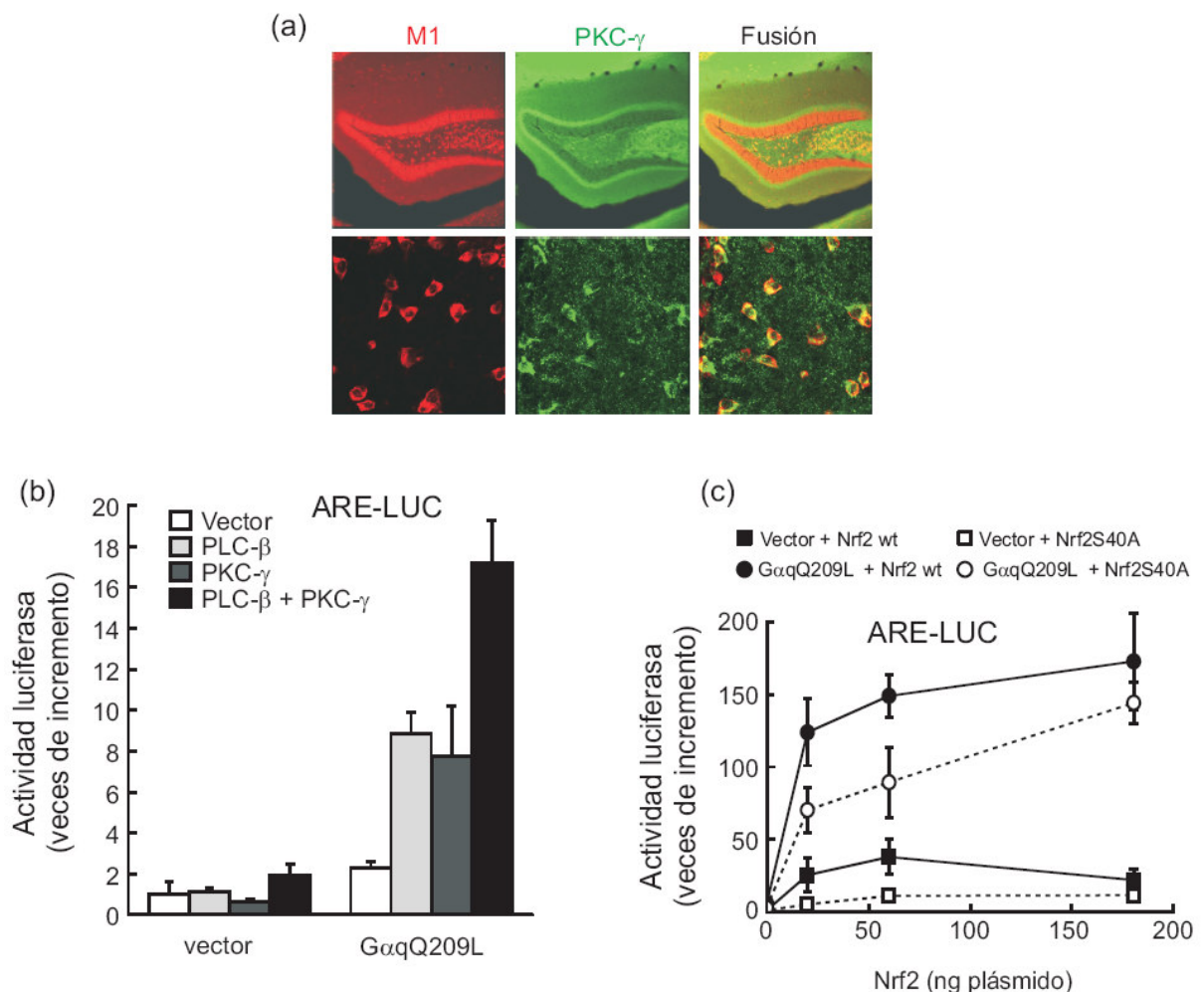


Figura 19. PLC- β y PKC- γ cooperan con G α q para activar los AREs. (a) Localización del receptor M1 y PKC- γ en rodajas de hipocampo de rata. (b) Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control) y con cantidades hasta 1200 ng de vector de expresión vacío o vectores de expresión para G α qQ209L, PLC- β y PKC- γ , como se indica. (c) La serina 40 de Nrf2 participa en la inducción de los AREs por G α q. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control) y con 300 ng del vector de expresión para G α qQ209L más cantidades crecientes del vector de expresión para Nrf2 o para el mutante Nrf2S40A, como se indica. Después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero durante 16 h y se analizó la actividad luciferasa.

En vista de la potente activación de los AREs a través de esta vía y considerando que Nrf2 es fosforilado por diversas PKCs en la serina en posición 40, llevando a su disociación de Keap1 (Huang *et al.* 2002; Bloom *et al.*, 2003), investigamos también la regulación de Nrf2 a través del eje Gαq/PKC. Las células PC12 se transfectaron con el ARE-LUC y con el vector de expresión para GαqQ209L más cantidades crecientes del vector de expresión para Nrf2 o para el mutante Nrf2S40A (Fig 19c). Como esperábamos, Nrf2 cooperó con GαqQ209L para inducir los AREs. Por otro lado, el mutante Nrf2S40A, insensible a PKC, inhibió parcialmente la inducción de los AREs a través de GαqQ209L, sobre todo a bajas concentraciones. Sin embargo, Nrf2S40A todavía cooperó con GαqQ209L para inducir los AREs. Estos resultados sugieren que la fosforilación directa de Nrf2 por la PKC en la serina 40 participa en la señalización desde Gαq hasta Nrf2, pero como el mutante que carece de dicha serina todavía fue capaz de activar los AREs, pensamos que otros factores actuando por debajo de PKC podrían estar involucrados también.

4.1.7. La inhibición de GSK-3β a través del receptor M1 activa a Nrf2.

Sabemos que PKC inhibe a GSK-3β por fosforilación de su dominio auto-inhibitorio en la serina 9. Así que decidimos analizar el papel de GSK-3β en la regulación de Nrf2 a través del receptor M1. Las células PC12M1 se mantuvieron en medio sin suero durante 16 h y tras este tiempo se incubaron con Cch durante 10 min. En experimentos adicionales las células se pre-incubaron con queleritrina o con el inhibidor selectivo de la PI3K, LY294002, durante 30 min antes de la adición del Cch, como se indica en la figura 20a. El Cch indujo la fosforilación de GSK-3β en la serina 9 y por tanto su inhibición. Por el contrario, las células pretratadas con LY294004 y con queleritrina presentaron una fosforilación menor de GSK-3β (menor en el caso de la queleritrina, lo que indica que es la vía predominante en la fosforilación de GSK-3β a través del receptor M1).

Después analizamos el efecto de la inhibición de GSK-3β por el SB216763 (un inhibidor potente y selectivo de GSK-3β permeable a la membrana plasmática con una IC₅₀=34 nM) en la activación de los AREs por Cch. Como se muestra en la figura 20b, la inhibición de GSK-3β fue suficiente para activar los AREs hasta valores próximos a los del Cch solo. Resultados similares se obtuvieron con LiCl (50 mM; EC₅₀=2mM). Estos resultados sugieren que una parte importante del efecto del Cch en la activación de Nrf2 está mediado por GSK-3β, pero no excluye otras vías alternativas, ya que el tratamiento combinado de los inhibidores de GSK-3β y el Cch incrementó la activación del ARE-LUC con respecto a la obtenida con el Cch solo.

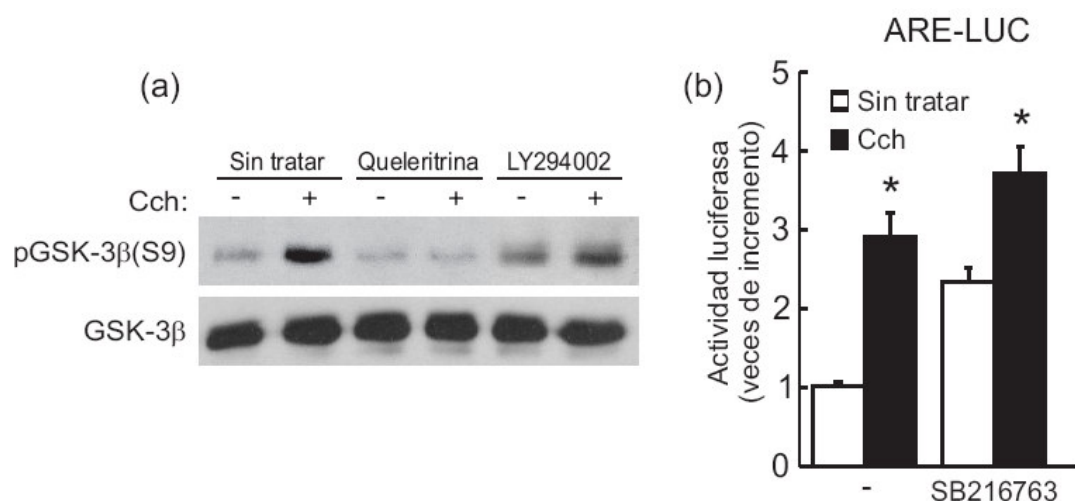


Figura 20. La inhibición de GSK-3 β a través del receptor M1 activa los AREs. (a) La fosforilación de GSK-3 β en la serina 9 en respuesta a Cch es dependiente de PKC. Las células PC12M1 se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero durante 16 h y posteriormente se les retiró el suero y se pre-incubaron con 10 μ M de quelerritrina o 30 μ M de LY294002 durante 30 min y finalmente con 1 mM de Cch durante 10 min. Panel superior: anti-fosfo-GSK-3 β (S9). Panel inferior: anti-GSK-3 β , mostrando una carga similar de proteína por cada calle. (b) La activación de los AREs por Cch se incrementa en presencia del inhibidor de GSK-3 β , SB216763. Las células PC12 se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3-basic como control) y con 700 ng del vector de expresión para M1 (pCEFL-M1). Después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero y se incubaron con SB216763 (10 μ M) durante 16 h. El Cch (1 mM) se añadió 30 min después del SB216763. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre los grupos sin tratar y los grupos tratados con Cch.

Para confirmar estos resultados, analizamos la distribución subcelular de Nrf2 en células PC12M1 transfectadas con vectores de expresión para Nrf2-V5, para el mutante inactivo de GSK-3 β (GSK-3 β (Y216F)), como control negativo, y para el mutante constitutivamente activo de GSK-3 β , que carece de la serina en posición 9 y por tanto no puede ser regulado por PKC (GSK-3 β (Δ 9)). Ambos mutantes tienen una etiqueta de hemaglutinina (HA). Después de la transfección, las células se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero durante 24 h y posteriormente se les retiró el suero y se incubaron con 1 mM de Cch durante 30 min. Como se muestra en la figura 21a, Nrf2-V5 apenas se detectó en el citosol o en el núcleo de células sin tratar. Sin embargo, el Cch indujo un notable incremento en los niveles nucleares de Nrf2-V5 de acuerdo con los datos de la figura 16f del Nrf2 endógeno. Además, la expresión del mutante activo GSK-3 β - Δ 9 bloqueó parcialmente la translocación nuclear de Nrf2-V5 inducida por Cch. Estos resultados indican que es necesaria la inhibición de GSK-3 β por el receptor M1 para una activación completa de Nrf2.

Finalmente, analizamos el efecto de GSK-3 β - Δ 9 en la activación de los AREs por G α q. Las células PC12 se transfectaron con ARE-LUC (o pGL3basic como control) y el vector de expresión para G α qQ209L, además de cantidades crecientes del vector de expresión para GSK-3 β - Δ 9 como se indica en la figura 21b. G α qQ209L activó al reportero ARE-LUC como se esperaba. La co-transfección con GSK-3 β - Δ 9 produjo una inhibición de la activación del ARE-LUC por G α qQ209L de manera dosis-dependiente (a mayor cantidad de GSK-3 β - Δ 9, menor activación del ARE-LUC).

Todos estos resultados apoyan el modelo presentado en la figura 21c, en el cual la activación del receptor muscarínico M1 activa el eje $G\alpha q/PLC-\beta/PKC-\gamma$, lo que conduce a una inhibición de GSK-3 β y la consecuente activación de Nrf2.

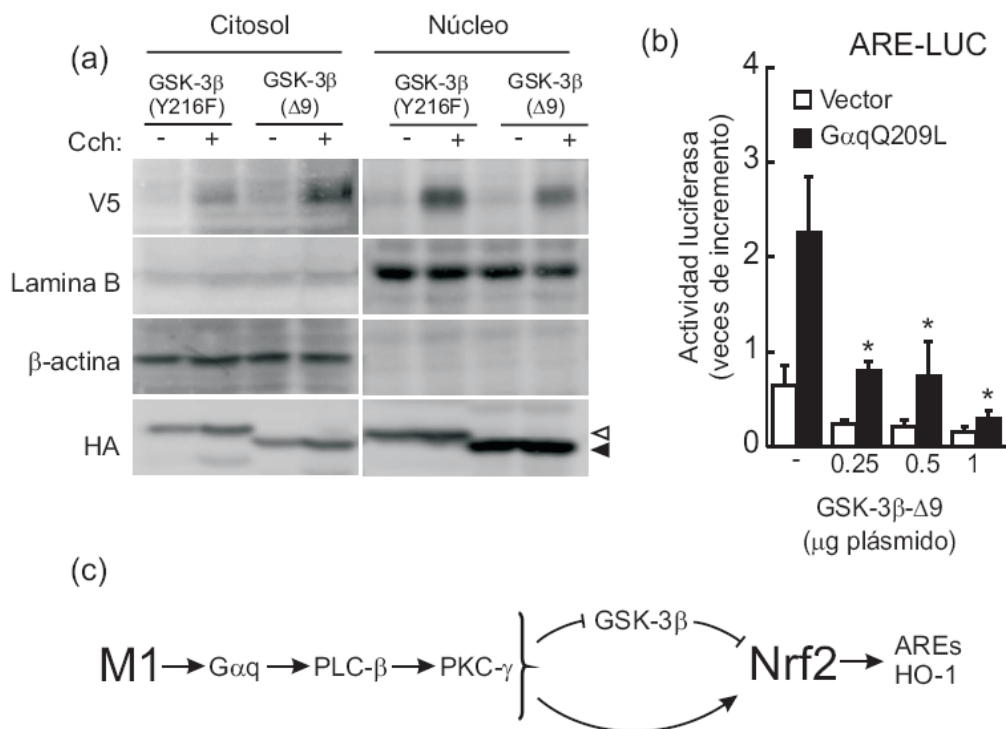


Figura 21. (a) GSK-3 β bloquea la translocación nuclear de Nrf2. Las células PC12M1 se transfectaron con cantidades hasta 6 μ g/placa del vector de expresión para Nrf2-V5 (pcDNA3.1V5HisBmNrf2), con el mutante inactivo de GSK-3 β (GSK3 β -(Y216F)), como control negativo, y con el mutante constitutivamente activo de GSK-3 β (GSK3 β - $\Delta 9$), ambos con una etiqueta de HA. Después de la transfección, las células se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero durante 24 h y posteriormente se les retiró el suero y se incubaron con 1 mM de Cch durante 30 min. Panel superior: anti-V5. Panel medio-superior: anti-lamina B, mostrando los extractos nucleares. Panel medio-inferior: anti- β -actina, mostrando los extractos citosólicos. Panel inferior: anti-HA, mostrando la expresión ectópica del mutante inactivo, GSK-3 β -HA-(Y216F) (flecha blanca) y del mutante constitutivamente activo, GSK-3 β -HA- $\Delta 9$ (flecha negra). (b) El mutante activo de GSK-3 β (GSK-3 β - $\Delta 9$) bloquea la activación de los AREs por G α qQ209L. Las células PC12M1 se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control), 300 ng de G α qQ209L, y con cantidades crecientes de GSK-3 β - $\Delta 9$, como se indica. Después de la transfección las células se mantuvieron en medio sin suero durante 16 h y se analizó la actividad luciferasa. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre el grupo G α qQ209L control y cada uno de los grupos transfectados con G α qQ209L y GSK-3 β - $\Delta 9$. (c) Modelo mostrando la vía de señalización identificada en este estudio para activar Nrf2 a través del receptor muscarínico M1.

4.1.8. La activación del eje Nrf2/HO-1 a través del receptor M1 protege de la muerte celular inducida por H₂O₂.

Para determinar si el receptor muscarínico M1 podría producir una respuesta citoprotectora frente a estrés oxidativo analizamos primero la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo como una evidencia de muerte celular (Fig 22a). Las células PC12M1 se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero en presencia o ausencia de Cch (1 mM) durante 16 h y posteriormente se incubaron con H₂O₂ (200 o 400 μ M) durante 6 h. Las células sin tratar presentaron

un nivel bajo de liberación de LDH al medio de cultivo, posiblemente debido a la baja concentración de suero. El H_2O_2 produjo un incremento en la liberación de LDH de manera dosis-dependiente. Por otro lado, el Cch produjo una reducción significativa en los niveles de LDH extracelular, sugiriendo un papel de los receptores colinérgicos en citoprotección.

También analizamos los niveles de caspasa-3 activa como una estimación de muerte celular por apoptosis (Fig 22b) en presencia de 400 μM de H_2O_2 . De nuevo, las condiciones deficitarias en suero del medio produjeron un pequeño incremento en los niveles de caspasa-3 activa. El H_2O_2 produjo un incremento notorio en los niveles de esta proteína. Por el contrario, el Cch redujo sustancialmente los niveles de caspasa-3 activa, indicando un efecto citoprotector frente a H_2O_2 . Para determinar el papel del receptor M1 en citoprotección tratamos las células PC12M1 con el antagonista específico del receptor M1, la diciclomina (DCC). Este compuesto indujo un pequeño incremento en los niveles de caspasa-3 activa por sí mismo, pero lo que es más importante, inhibió el efecto protector del Cch.

Estas observaciones señalan al receptor muscarínico M1 como un elemento importante en protección frente a estrés oxidativo.

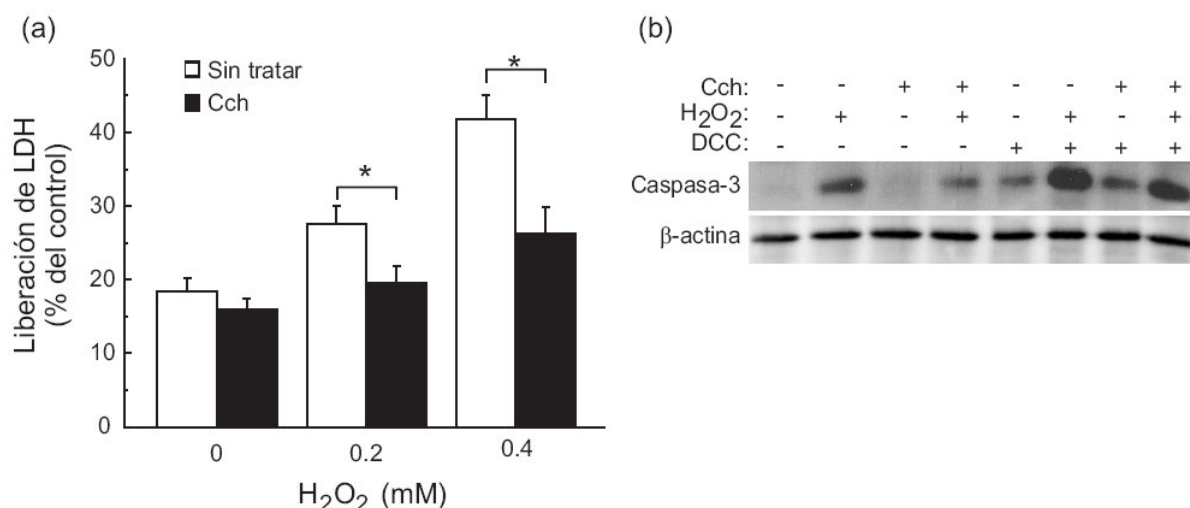


Figura 22. El Cch protege a las células PC12M1 de la muerte celular inducida por H_2O_2 . (a) Ensayo de liberación de LDH. Las células PC12M1 se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero durante 16 h en presencia o ausencia de 1 mM de Cch, como se indica. Posteriormente las células se incubaron con H_2O_2 (200 y 400 μM) durante 6 h y la cantidad de LDH liberada al medio de cultivo se expresó como % de LDH total (extracelular e intracelular). Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre el grupo sin tratar y cada uno de los grupos tratados con Cch. (b) Niveles de caspasa-3 activa. Las células PC12M1 se mantuvieron en medio DMEM al 0,25% de suero en presencia de Cch (1 mM) o DCC (10 μM) durante 16 h. La DCC se añadió 30 min antes de añadir el Cch. Tras ese tiempo se incubaron con 400 μM de H_2O_2 durante 6 h. Panel superior: caspasa-3 activa. Panel inferior: β -actina, indicando una carga similar de proteína por cada calle.

4.2. REGULACIÓN DEL EJE NRF2/HO-1 POR EL RECEPTOR PURINÉRGICO P2Y₁₃.

4.2.1. El ADP y el 2MeSADP inducen la expresión de HO-1.

Analizamos primero la posibilidad de que los receptores purinérgicos pudieran modificar la expresión de HO-1. Las NGCs se mantuvieron durante 10 días *in vitro* (DIV) en medio Neurobasal-A completo. Tras ese tiempo se estimularon durante 6 h con las concentraciones de ADP que se muestran en las Figs. 23a y 23b, y se analizó la cantidad de proteína por *immunoblot*. El ADP produjo un incremento significativo en los niveles de HO-1, que fue más evidente a concentraciones superiores a 0,1 μ M. El 2-metiltio-ADP (2MeSADP), un agonista más resistente a degradación extracelular que el ADP, indujo la expresión de HO-1 en un rango de concentraciones similar (Figs. 23c y 23d).

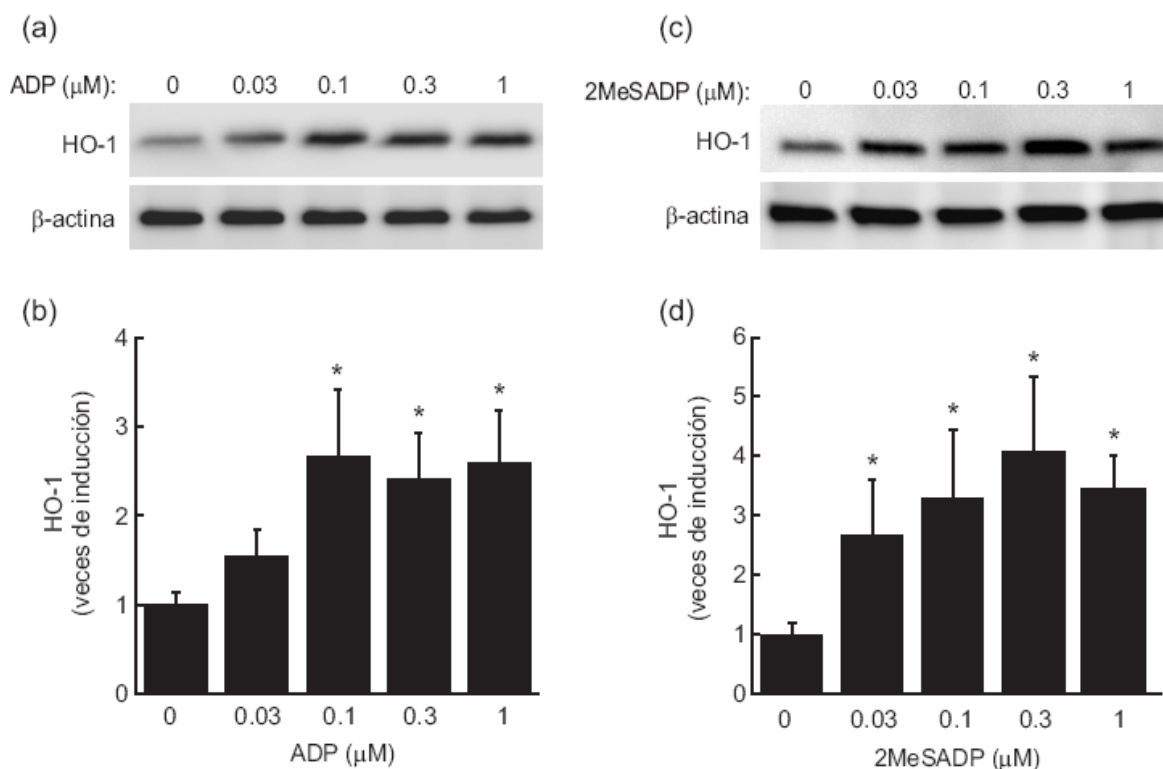


Figura 23. El ADP y el 2MeSADP inducen la expresión de HO-1. (a) y (c) Niveles de HO-1 en NGCs tratadas con las concentraciones indicadas de ADP y de 2MeSADP durante 6 h. Paneles superiores: anti-HO-1. Paneles inferiores: anti- β -actina, mostrando una carga similar de proteína por cada calle. (b) y (d) Cuantificaciones densitométricas de (a) y (c), respectivamente. Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre los grupos tratados y el grupo control sin tratar.

Los niveles de ARN mensajero (ARNm) de la HO-1 se incrementaron también tras 3 y 6 h de estimulación con 2MeSADP (Figs 24a y 24b). Además, el incremento en los niveles de ARNm fue sensible a cicloheximida (CHX), como se muestra por PCR semicuantitativa (Fig 24c), sugiriendo que la inducción de HO-1 implica la síntesis *de novo* de un factor de transcripción lábil, como pudiera ser Nrf2. El hecho de que ambos ligandos incrementen los niveles de HO-1 sugiere un papel de los receptores P2Y en la regulación del gen *Hmox1*.

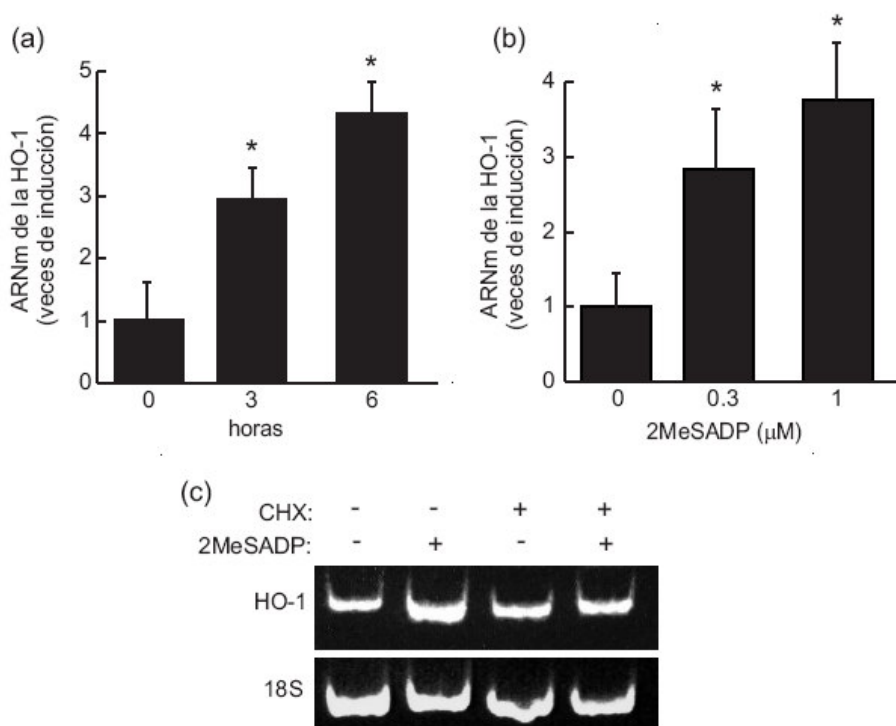


Figura 24. El 2MeSADP induce la expresión del ARNm de la HO-1 en NGCs tratadas con (a) 1 μ M de 2MeSADP durante 3 y 6 h, o (b) 0,3 y 1 μ M de 2MeSADP durante 6 h. Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre el grupo control y los grupos tratados. (c) PCR semicuantitativa mostrando el incremento en los niveles de ARNm de la HO-1 y su bloqueo por cicloheximida (CHX).

4.2.2. El 2MeSADP utiliza el receptor purinérgico P2Y₁₃ para inducir la expresión de HO-1 en NGCs.

Entre los tres receptores a los que se une el 2MeSADP, el P2Y₁ y P2Y₁₃ se expresan en NGCs de rata y ratón (Fig 25a), mientras que el P2Y₁₂ apenas se detecta, como muestra la inmunofluorescencia hecha en NGCs de rata (Fig 25b). Para discriminar entre los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃ utilizamos antagonistas específicos, MRS2179 y MRS2211, respectivamente. La pre-incubación con MRS2179 (10 μ M durante 10 min), no alteró significativamente la inducción de HO-1 por el 2MeSADP (Figs 25c y 25d). Por el contrario, el MRS2211, en las mismas condiciones experimentales, bloqueó sustancialmente este efecto (Figs 25e y 25f). Esto indica un papel relevante del receptor P2Y₁₃ en la inducción de HO-1. Como el receptor P2Y₁₃ se acopla a la subunidad G α i de las proteínas G heterotriméricas, analizamos el efecto del inhibidor de dicha subunidad, la toxina pertussis (PTX). Como se muestra en la figura 25g, la PTX bloqueó la inducción de HO-1 mediada por 2MeSADP.

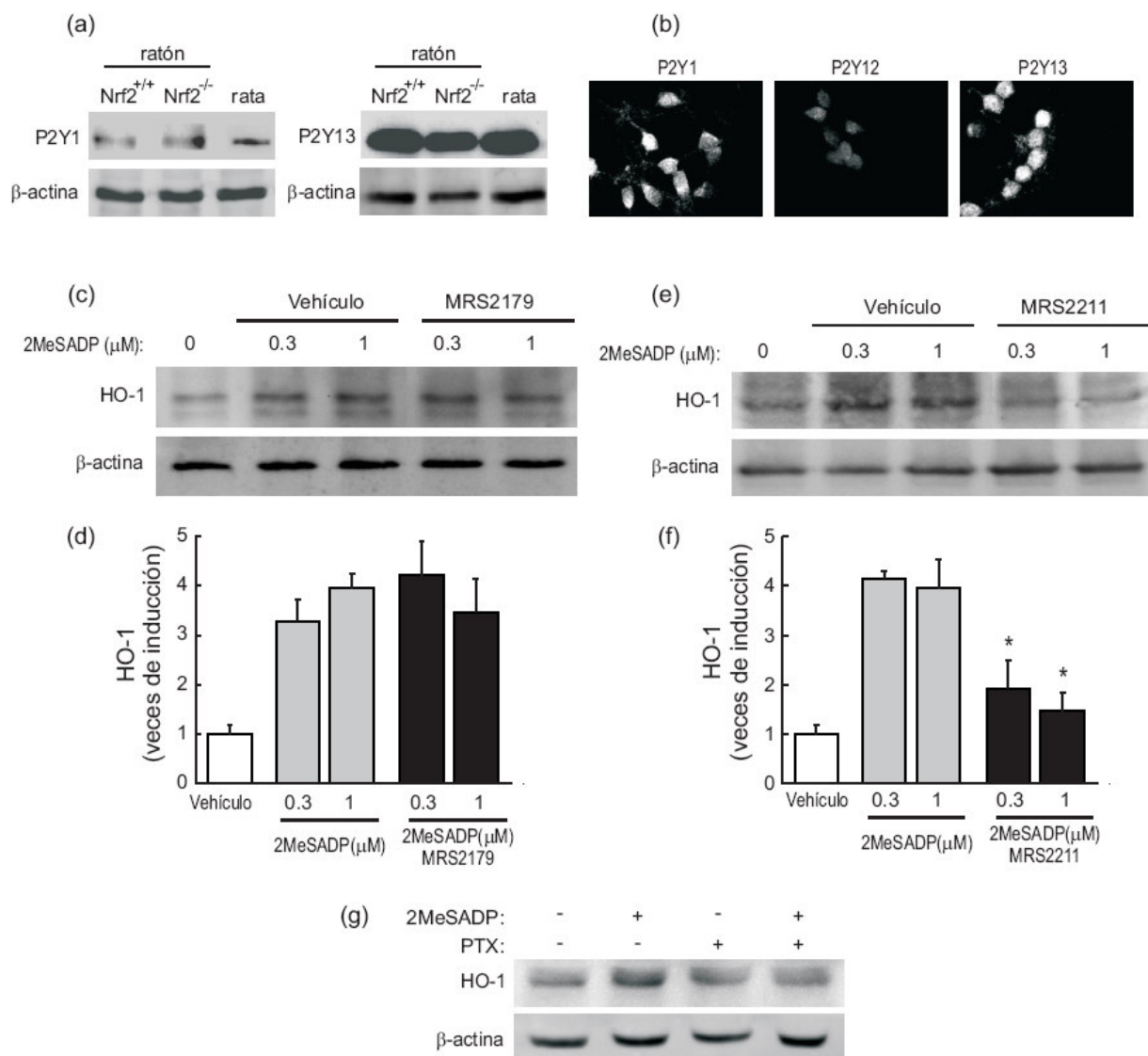


Figura 25. El 2MeSADP utiliza el receptor purinérgico P2Y₁₃ para inducir la expresión de *Hmox1* en NGCs. (a) Niveles de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃ en NGCs de ratón y rata por *immunoblot*. Paneles superiores: anti-P2Y₁ y P2Y₁₃. Paneles inferiores: anti-β-actina. (b) Niveles de los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ en NGCs de rata por *inmunofluorescencia*. (c) Niveles de HO-1 en NGCs tratadas con 10 μM del antagonista del receptor P2Y₁, MRS2179, durante 10 min, y posteriormente con 0,3 o 1 μM de 2MeSADP durante 6 h, como se indica. (e) Niveles de HO-1 en NGCs tratadas con 10 μM del antagonista del receptor P2Y₁₃, MRS2211, durante 10 min, y posteriormente con 0,3 o 1 μM de 2MeSADP durante 6 h, como se indica. Paneles superiores: anti-HO-1. Paneles inferiores: anti-β-actina. (d) (f) Cuantificaciones densitométricas de (c) y (e). Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre el grupo tratado con 2MeSADP y MRS2211 y los grupos tratados sólo con 2MeSADP. (g) Niveles de HO-1 en NGCs tratadas con 10 ng/ml de la toxina pertussis (PTX) y 1 μM de 2MeSADP. El 2MeSADP se añadió 24 h después de la PTX, durante 6 h. Panel superior: anti-HO-1. Panel inferior: anti-β-actina.

Finalmente analizamos el efecto de la sobre-expresión ectópica del receptor P2Y₁₃ en un ensayo de luciferasa en células de neuroblastoma N2A, que presentan niveles muy bajos de receptores P2Y₁ y P2Y₁₃ cuando se comparan con los niveles en NGCs por PCR semicuantitativa (Fig 26a). Las células se transfectaron con el vector de expresión para el receptor P2Y₁₃ y también con el plásmido reportero ARE-LUC, o paralelamente con el plásmido pGL3basic como control. Después de la transfección, las

células se pusieron en medio sin suero y se incubaron con 2MeSADP durante 16 h. El 2MeSADP no alteró significativamente los niveles de actividad luciferasa en células transfectadas con vector control (pCDNA 3.1), por el contrario, las células transfectadas con el vector de expresión pCDNA3.1-V5HisTOPO-P2Y₁₃ respondieron al 2MeSADP de manera dosis-dependiente (Fig 26b), con máximos valores de actividad luciferasa en un rango de concentración similar al descrito para la inducción de HO-1 en NGCs (Fig 23). Por tanto, nuestros resultados identifican al receptor purinérgico P2Y₁₃ como responsable de la señalización hacia *Hmox1*.

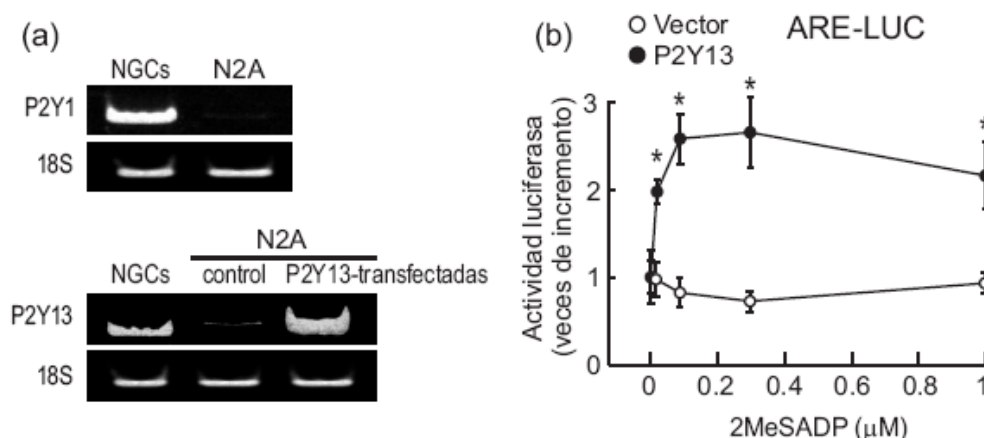


Figura 26. (a) Niveles de ARNm de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃ en NGCs y en células N2A mediante PCR semicuantitativa. Paneles superiores: niveles del receptor P2Y₁ en NGCs y en células N2A. Paneles inferiores: niveles del receptor P2Y₁₃ en NGCs y en células N2A control o transfectadas con el P2Y₁₃. (b) Inducción del ARE-LUC por 2MeSADP en células N2A que expresan ectópicamente el receptor P2Y₁₃. Las células N2A se transfectaron con 300 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control) y con 700 ng de vector vacío (pCDNA3.1) o de vector de expresión para el receptor P2Y₁₃ (pCDNA3.1-V5HisTOPO-P2Y₁₃). A las 5 h de la transfección las células se incubaron con concentraciones crecientes de 2MeSADP en medio DMEM sin suero durante 16 h, y posteriormente se analizó la actividad luciferasa. Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre el grupo transfectado con vector vacío y el transfectado con el receptor P2Y₁₃.

4.2.3. El 2MeSADP induce la activación del factor de transcripción Nrf2.

El promotor del gen *Hmox1* contiene elementos de respuesta para numerosos factores de transcripción, pero el hecho de que la cicloheximida bloqueara la inducción de HO-1 (Fig 24) nos hizo pensar que el 2MeSADP utiliza un factor de transcripción de vida media corta para la activación de *Hmox1*, como Nrf2. Así que analizamos su implicación en un ensayo de luciferasa utilizando el plásmido reportero ARE-LUC. Las NGCs se transfectaron utilizando el reactivo Neuromag con el plásmido reportero ARE-LUC, y después de la transfección se incubaron con 1 μ M de 2MeSADP o 50 μ M de tert-butil-hidroquinona (tBHQ), como control positivo, durante 16 h. Como se muestra en la figura 27c, tanto la tBHQ como el 2MeSADP incrementaron los valores de actividad luciferasa con una eficiencia similar, indicando que el 2MeSADP activa la transcripción dependiente de Nrf2.

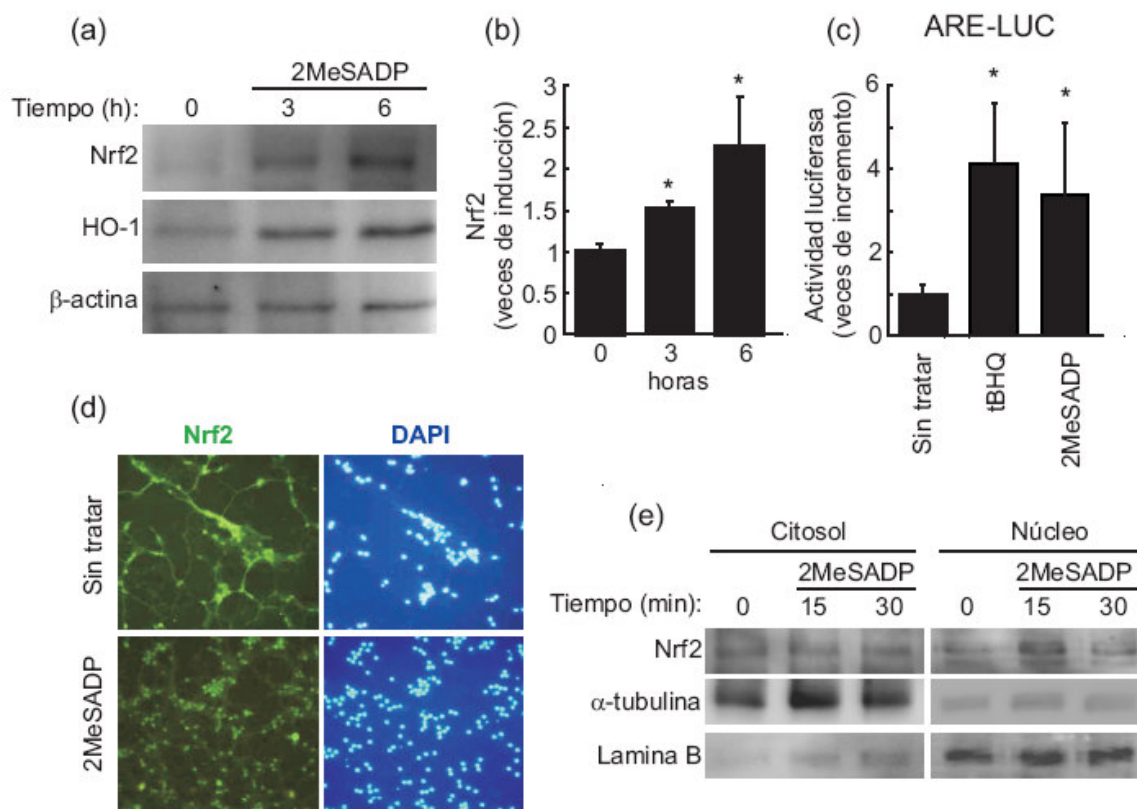


Figura 27. El 2MeSADP induce la activación del factor de transcripción Nrf2. (a) Niveles de Nrf2 en NGCs tratadas con 1 μ M de 2MeSADP durante 3 y 6 h. Panel superior: anti-Nrf2. Panel medio: anti-HO-1, como control positivo. Panel inferior: anti- β -actina. (b) Cuantificación densitométrica de (a). Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. (c) Inducción del ARE-LUC por 2MeSADP. Las NGCs se transfectaron con ARE-LUC (o pGL3basic como control). A las 24 h de la transfección las células se incubaron con 1 μ M de 2MeSADP o con 50 μ M de tert-butil-hidroquinona (tBHQ) durante 16 h y se analizó la actividad luciferasa. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre el grupo sin tratar y los grupos tratados. (d) El 2MeSADP induce la translocación nuclear de Nrf2 mediante inmunofluorescencia. Las NGCs se incubaron en presencia o en ausencia de 2MeSADP durante 15 min y se realizó una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Nrf2, y los núcleos se tiñeron con DAPI. (e) El 2MeSADP induce la translocación nuclear de Nrf2 en ensayos de fraccionamiento subcelular. Las NGCs se incubaron con 1 μ M de 2MeSADP durante los tiempos indicados. Panel superior: anti-Nrf2. Panel medio: anti- α -tubulina, mostrando los extractos citosólicos. Panel inferior: anti-lamina B, mostrando los extractos nucleares.

Además, como se muestra en los ensayos de fraccionamiento subcelular (Fig 27e) y por inmunofluorescencia (Fig 27d), el 2MeSADP indujo una translocación de Nrf2 al núcleo, que fue más evidente tras 15 min de incubación. También los niveles totales de Nrf2 se incrementaron tras 3 y 6 h de incubación con 1 μ M 2MeSADP (Figs 27a y 27b).

Otro abordaje para determinar la necesidad de Nrf2 se hizo comparando la expresión de HO-1 en NGCs procedentes de ratones silvestres (Nrf2^{+/+}) y de ratones nulos para Nrf2 (Nrf2^{-/-}). Como se muestra en las figuras 28a y 28c, en NGCs de ratones Nrf2^{+/+} el 2MeSADP indujo un incremento en los niveles de HO-1 similar al obtenido en NGCs de rata (Fig 23). Por el contrario, las NGCs de ratones Nrf2^{-/-} no respondieron al 2MeSADP (Figs 28b y 28c).

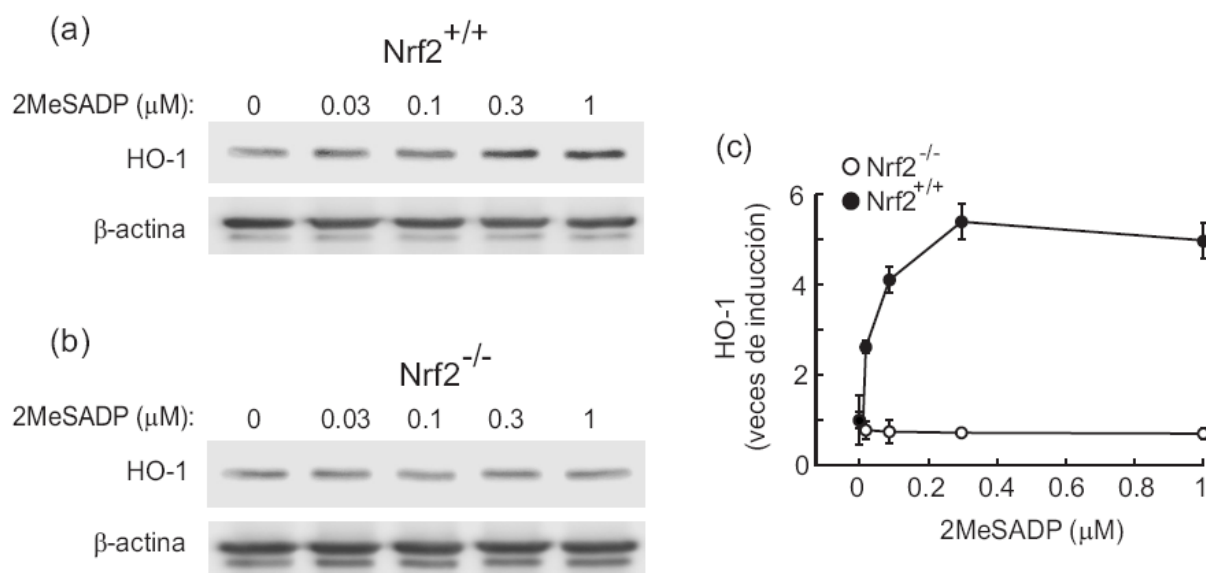


Figura 28. El 2MeSADP necesita a Nrf2 para inducir la expresión de HO-1 en NGCs. (a) Niveles de HO-1 en NGCs de ratones Nrf2^{+/+} tratados con las concentraciones indicadas de 2MeSADP durante 6 h. (b) Niveles de HO-1 en NGCs de ratones Nrf2^{-/-} tratados con las concentraciones indicadas de 2MeSADP durante 6 h. Paneles superiores: anti-HO-1. Paneles inferiores: anti-β-actina. (c) Cuantificación densitométrica de (a) y (b). Cada punto es la media de tres muestras ± D.E.

4.2.4. El 2MeSADP protege a las NGCs frente a H₂O₂.

La incubación de NGCs con H₂O₂ redujo los niveles de GSH de manera dosis-dependiente. Sin embargo, cuando las neuronas se preincubaron con 2MeSADP (1 μM durante 16 h) observamos una recuperación parcial de los niveles de GSH a dosis bajas de H₂O₂ (12,5 y 25 μM) (Fig 29a).

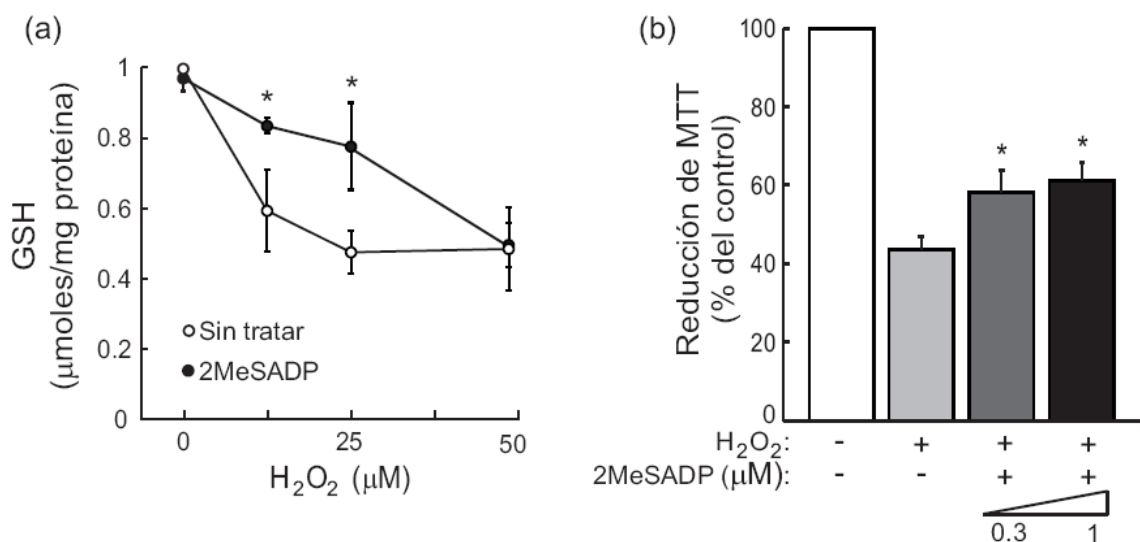
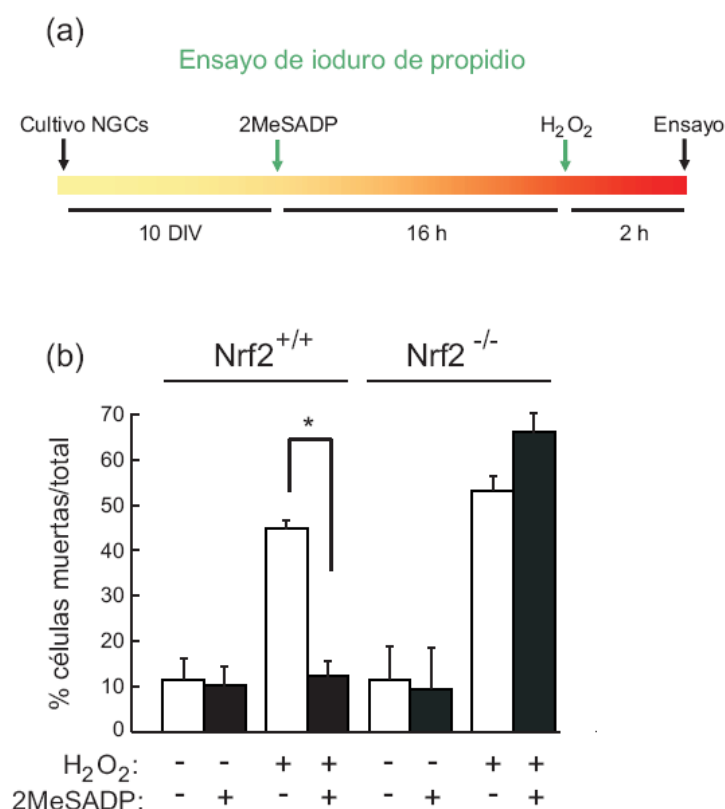


Figura 29. El 2MeSADP protege a las NGCs de la neurotoxicidad inducida por H₂O₂. (a) Las NGCs se incubaron en presencia o ausencia de 1 μM de 2MeSADP durante 16 h y posteriormente se incubaron con 12,5, 25 y 50 μM de H₂O₂ durante 2 h. Los niveles de GSH se analizaron con la sonda monoclorobimano. Cada punto es la media de tres muestras ± D.E. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una p<0,05 entre los grupos sin tratar y los grupos tratados. (b) Evaluación del efecto del 2MeSADP sobre la neurotoxicidad inducida por H₂O₂ por el método del MTT. El 2MeSADP se añadió 16 h antes de la exposición de las células al H₂O₂ durante 2 h. La viabilidad celular se evaluó 24 h después del tratamiento con 2MeSADP. Cada punto es la media de tres muestras ± D.E. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una p<0,05 entre el grupo tratado sólo con H₂O₂ v.s. los grupos tratados con 2MeSADP y H₂O₂.

Estos datos son consistentes con los ensayos de MTT de la figura 29b. La incubación de NGCs durante 2 h con 25 μM de H_2O_2 redujo la viabilidad celular al 43%. Sin embargo, las neuronas que habían sido pretratadas con 0,3 y 1 μM de 2MeSADP durante 16 h presentaron una reducción de MTT del 58% y 61%, respectivamente, indicando que la actividad mitocondrial de estas neuronas es mayor.

4.2.5. El 2MeSADP necesita a Nrf2 para proteger a las NGCs de la muerte inducida por H_2O_2 .

Para determinar la relevancia de Nrf2 en la neuroprotección frente a H_2O_2 , las NGCs de ratones $\text{Nrf2}^{+/+}$ y $\text{Nrf2}^{-/-}$ se mantuvieron en medio Neurobasal-A durante 7 días, posteriormente se incubaron con 2MeSADP (1 μM durante 16 h) y después se estimularon con 25 μM de H_2O_2 durante 2 h. Tras esto, las neuronas se incubaron con 5 μM de yoduro de propidio (IP) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hoechst 33342 durante 20 min, como está descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente se tomaron imágenes con un microscopio invertido. Las figuras 30c y 30d muestran las imágenes tomadas a microscopía. Los resultados se cuantificaron como porcentaje de núcleos dañados (teñidos con IP) v.s el total de núcleos (teñidos con Hoechst 33342), como se muestra en la figura 30b. Ambos tipos de neuronas presentaron una muerte basal de aproximadamente un 10%, como era de esperar por el bajo aporte de antioxidantes en el medio (medio Neurobasal-A suplementado con B27 sin antioxidantes, como se indica en Materiales y Métodos). El 2MeSADP no alteró este valor de manera significativa. Sin embargo, cuando ambos tipos de neuronas se incubaron con H_2O_2 , el 2MeSADP bloqueó casi en su totalidad la muerte celular en neuronas de ratones $\text{Nrf2}^{+/+}$, pero no tuvo ningún efecto en neuronas de ratones $\text{Nrf2}^{-/-}$, que, a pesar de la presencia del 2MeSADP, presentaron un porcentaje similar de muerte celular inducida por el H_2O_2 . Estos resultados indican que el 2MeSADP necesita a Nrf2 para producir una respuesta neuroprotectora.



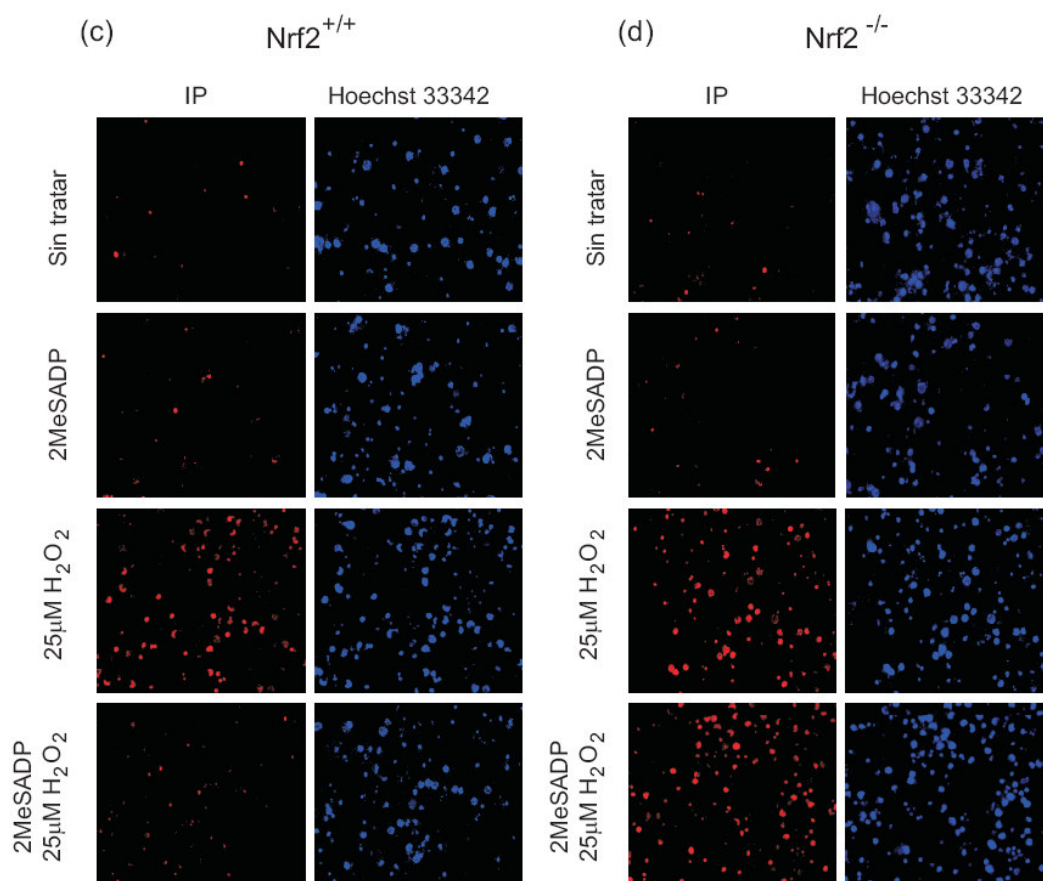
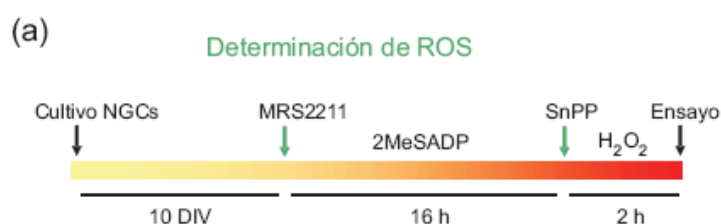


Figura 30. El 2MeSADP necesita a Nrf2 para proteger a las NGCs de la muerte celular inducida por H_2O_2 . (a) Esquema de cómo se realizó el ensayo de viabilidad en las NGCs. (b) El efecto protector del 2MeSADP se bloquea en NGCs de ratones $Nrf2^{-/-}$. Las NGCs se incubaron en presencia o ausencia de $1\ \mu M$ de 2MeSADP durante 16 h y posteriormente se añadió H_2O_2 ($25\ \mu M$) durante 2 h. Después, las NGCs se incubaron con IP durante 20 min y se tiñeron los núcleos con Hoescht33342. Se tomaron tres fotografías para cada condición experimental, y se cuantificó la intensidad de fluorescencia con el programa *NIS Elements*. Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos teñidos con IP v.s. el total de núcleos, teñidos con Hoescht33342. Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. El asterisco muestra diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre los grupos indicados. (c) (d) Fotografías representativas de las células tratadas como en (b).

4.2.6. El 2MeSADP necesita a la HO-1 y al receptor $P2Y_{13}$ para atenuar el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 .

Para determinar la contribución de la HO-1 en la protección frente a estrés oxidativo, utilizamos el inhibidor de HO-1, protoporfirina de estaño (SnPP). Las NGCs se incubaron con 2MeSADP ($1\ \mu M$ durante 16 h) para incrementar los niveles de HO-1. Después las células se preincubaron con SnPP ($10\ \mu M$ durante 15 min) y posteriormente con H_2O_2 ($25\ \mu M$ durante 2 h). Tras esto, las neuronas se incubaron con $1\ \mu M$ H_2DCFDA durante 20 min en oscuridad a $25^\circ C$.



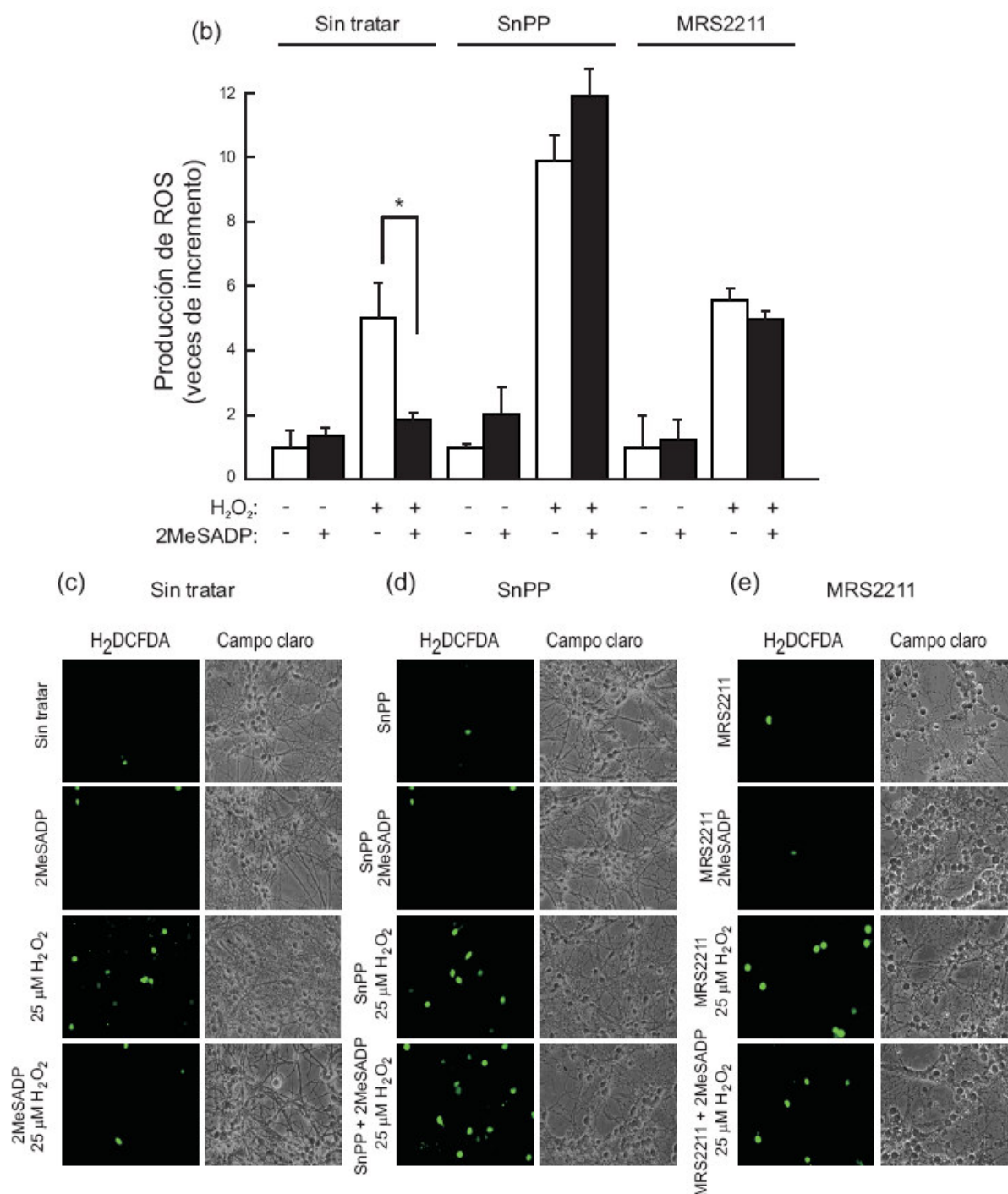
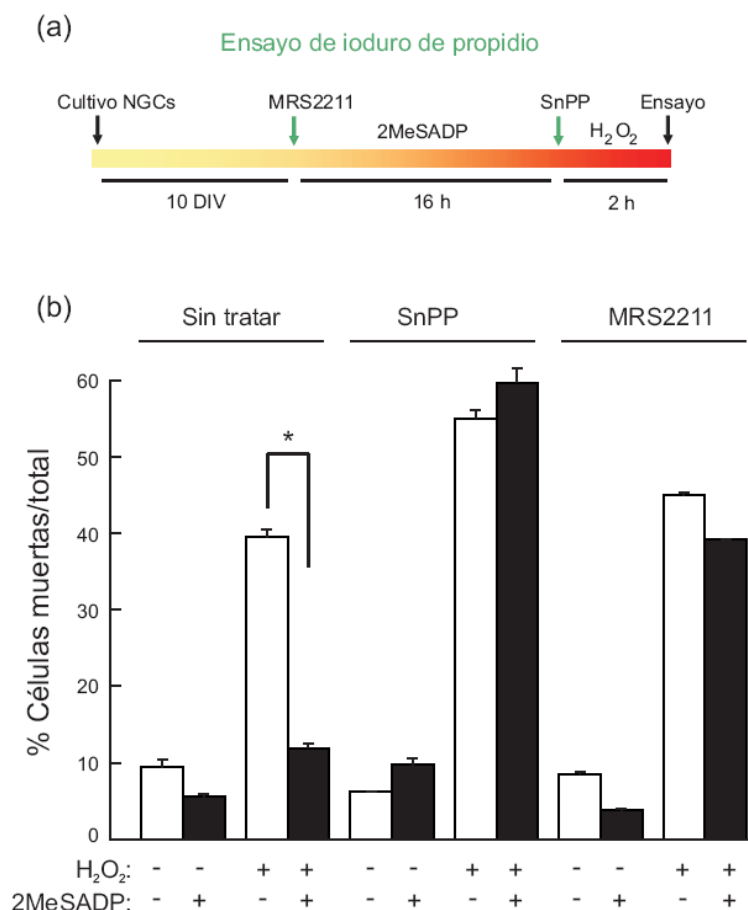


Figura 31. El 2MeSADP atenúa el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ de una manera dependiente de HO-1 y del receptor P2Y₁₃. (a) Esquema de cómo se realizó el ensayo de determinación de ROS en las NGCs. (b) Las NGCs se incubaron en presencia o ausencia de 1 μ M de 2MeSADP durante 16 h, después se incubaron con 10 μ M del inhibidor de HO, SnPP, durante 15 min, y posteriormente se trataron con H₂O₂ (25 μ M) durante 2 h. En el caso del MRS2211, las NGCs se incubaron con 10 μ M de MRS2211 durante 10 min, después se incubaron con 1 μ M de 2MeSADP durante 16 h y posteriormente se trataron con H₂O₂ (25 μ M) durante 2 h. Finalmente, las NGCs se incubaron con la sonda H₂DCFDA durante 20 min. Se tomaron tres fotografías para cada condición experimental, y se cuantificó la intensidad de fluorescencia con el programa *NIS Elements*. Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia con respecto al H₂O₂, normalizando a una unidad. Cada punto es la media de tres muestras \pm E.E.M. El asterisco muestra diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre los grupos indicados. (c) (d) (e) Fotografías representativas de las células tratadas como en (b).

Como se muestra en la figura 31b, en ausencia de 2MeSADP, el H_2O_2 indujo un incremento en la fluorescencia de cuatro veces, en coherencia con la generación de ROS. Por el contrario, cuando las células se preincubaron con 2MeSADP, la mayor parte del efecto oxidativo se bloqueó (Figs 31b y 31c). Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia con respecto al H_2O_2 , normalizando a una unidad. Sin embargo, la SnPP bloqueó el efecto antioxidante del 2MeSADP. De hecho, la co-incubación de SnPP y H_2O_2 llevó a una mayor oxidación de la sonda (Figs 31b y 31d). De manera similar, determinamos la contribución del receptor $P2Y_{13}$ en la protección antioxidante del 2MeSADP, utilizando el antagonista del receptor $P2Y_{13}$, MRS2211. Las NGCs se pre-incubaron con MRS2211 (10 μ M durante 10 min) previamente a la adición de 2MeSADP (1 μ M durante 16 h), y de H_2O_2 durante 2 h. Finalmente, las neuronas se incubaron con 1 μ M H_2DCFDA durante los últimos 20 min. Como se muestra en las figuras 31b y 31e, el antagonista del receptor $P2Y_{13}$ bloqueó el efecto antioxidante del 2MeSADP. Todos estos resultados indican un papel relevante de la HO-1 y del receptor $P2Y_{13}$ en el efecto antioxidante del 2MeSADP.

4.2.7. El 2MeSADP necesita a la HO-1 y al receptor $P2Y_{13}$ para atenuar la muerte celular inducida por H_2O_2 .

Las NGCs se incubaron con 2MeSADP (1 μ M durante 16 h) para incrementar los niveles de HO-1. Después las células se preincubaron con SnPP (10 μ M durante 15 min) y posteriormente con H_2O_2 (25 μ M durante 2 h). Tras esto, las neuronas se incubaron con 5 μ M de IP y 100 μ g/ml de Hoechst 33342 durante 20 min en oscuridad a 25°C.



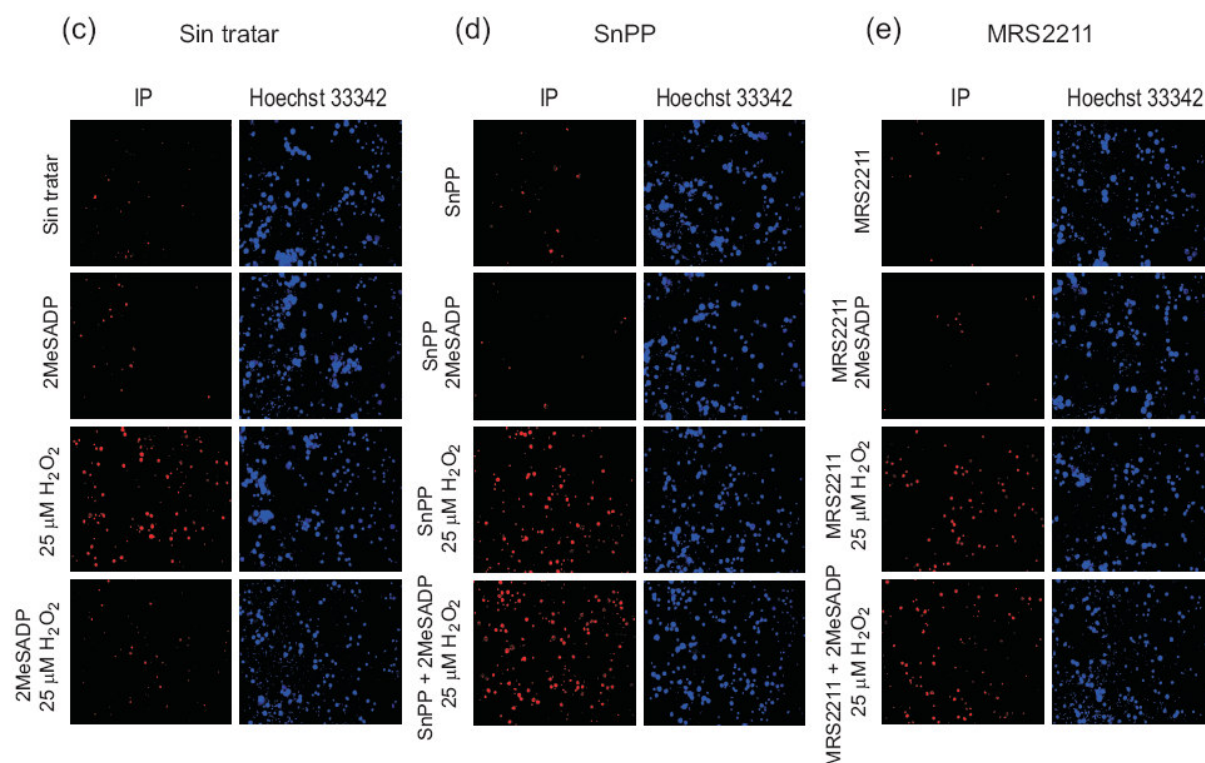


Figura 32. El 2MeSADP atenúa la muerte celular inducida por H_2O_2 de una manera dependiente de HO-1 y del receptor $P2Y_{13}$. (a) Esquema de cómo se realizó el ensayo de viabilidad en las NGCs. (b) Las NGCs se incubaron en presencia o ausencia de $1 \mu M$ de 2MeSADP durante 16 h, después se incubaron con $10 \mu M$ del inhibidor de HO, SnPP, durante 15 min, y posteriormente se trataron con H_2O_2 ($25 \mu M$) durante 2 h. En el caso del MRS2211, las NGCs se incubaron con $10 \mu M$ de MRS2211 durante 10 min, después se incubaron con $1 \mu M$ de 2MeSADP durante 16 h y posteriormente se trataron con H_2O_2 ($25 \mu M$) durante 2 h. Finalmente, las NGCs se incubaron con yoduro de propidio (IP) durante 20 min y se tiñeron los núcleos con Hoescht33342. Se tomaron tres fotografías para cada condición experimental, y se cuantificó la intensidad de fluorescencia con el programa *NIS Elements*. Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos teñidos con IP v.s. el total de núcleos, teñidos con Hoescht33342. Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. El asterisco muestra diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre los grupos indicados. (c) (d) (e) Fotografías representativas de las células tratadas como en (b).

Como se muestra en las figuras 32b y 32c, tanto las neuronas sin tratar como las tratadas con 2MeSADP presentaron un nivel basal bajo de incorporación de IP. Sin embargo, el H_2O_2 produjo una muerte celular de aproximadamente un 40%, que se redujo al 12% en presencia de 2MeSADP. La presencia de SnPP bloqueó el efecto protector del 2MeSADP (Figs 32b y 32d). El tratamiento combinado de SnPP y H_2O_2 produjo un porcentaje mayor de muerte celular incluso en presencia de 2MeSADP. En experimentos adicionales, analizamos el papel citoprotector del receptor $P2Y_{13}$ utilizando el antagonista MRS2211. Las NGCs se pre-incubaron con MRS2211 ($10 \mu M$ durante 10 min) previamente a la adición de 2MeSADP ($1 \mu M$ durante 16 h), y de H_2O_2 durante 2 h. Finalmente, las neuronas se incubaron con $5 \mu M$ de IP y $100 \mu g/ml$ de Hoescht 33342 durante los últimos 20 min. Como se muestra en las figuras 32b y 32e, el antagonista del receptor $P2Y_{13}$ bloqueó la respuesta citoprotectora mediada por 2MeSADP. Todos estos datos indican la relevancia de HO-1 y del receptor $P2Y_{13}$ en el efecto citoprotector del 2MeSADP.

4.3. REGULACIÓN FARMACOLÓGICA DEL EJE NRF2/HO-1 POR EL ÁCIDO NORDIHIIDROGUAYARÉTICO (NDGA).

4.3.1. El NDGA induce la activación del factor de transcripción Nrf2.

Como se muestra en la figura 33b, la distribución subcelular de Nrf2 en NGCs sin estimular fue preferentemente citosólica. Sin embargo, una incubación de 15 min con 20 μM de NDGA hizo que Nrf2 se translocara al núcleo. En experimentos adicionales, las NGCs se transfectaron con el plásmido reportero ARE-LUC (o pGL3basic como control) utilizando el reactivo Neuromag (Fig 33c). La incubación con 20 μM de NDGA (o 50 μM de tBHQ, como control positivo) durante 16 h incrementó la actividad luciferasa en 2 y 3,5 veces, respectivamente. Esta inducción también se observó en células PC12 (Fig 33d). Todos estos experimentos sugieren que el NDGA activa una respuesta antioxidante mediante la regulación de la expresión génica mediada a través de Nrf2.

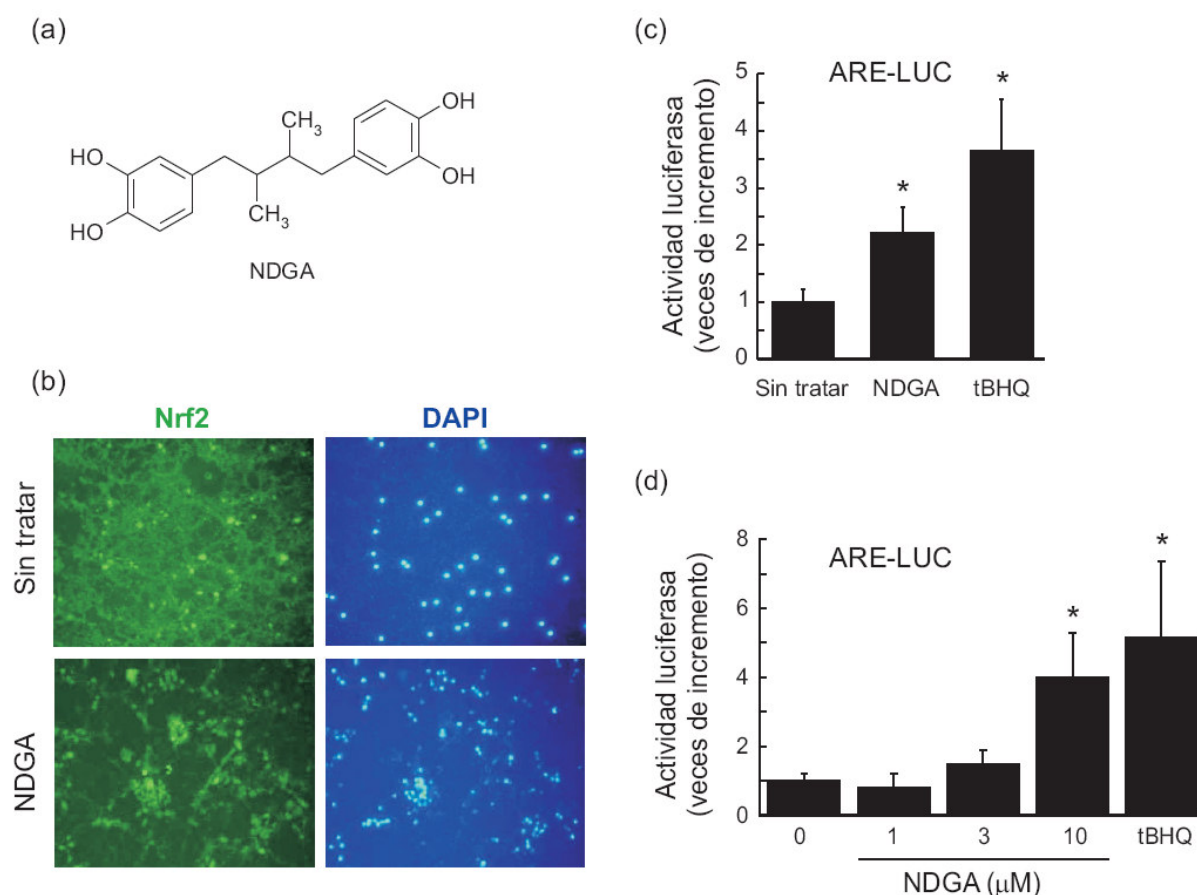


Figura 33. (a) Estructura del NDGA. (b) El NDGA induce la translocación de Nrf2 al núcleo. Las NGCs se incubaron en presencia o ausencia de NDGA (20 μM) durante 15 min y se realizaron las inmunofluorescencias con el anticuerpo anti-Nrf2, y los núcleos se tiñeron con DAPI. (c) Inducción del ARE-LUC por el NDGA en cultivos primarios de NGCs. Las NGCs se transfectaron con ARE-LUC (o pGL3basic como control). Al cabo de 24 h de la transfección las NGCs se incubaron con NDGA (20 μM) o con tBHQ (50 μM) durante 16 h y posteriormente se analizó la actividad luciferasa. (d) Inducción del ARE-LUC por el NDGA en células PC12. Las células PC12 se transfectaron con 500 ng de ARE-LUC (o pGL3basic como control). Al cabo de 5 h de la transfección las células se incubaron con NDGA (0, 1, 3 y 10 μM) o con tBHQ (50 μM) durante 16 h en medio DMEM sin suero y posteriormente se analizó la actividad luciferasa. Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre el grupo sin tratar y los grupos tratados con NDGA.

4.3.2. El NDGA induce la expresión de HO-1.

El NDGA (20 μ M) incrementó los niveles de ARNm de la HO-1 en más de tres veces tras 3 y 6 h de incubación, como se determinó por PCR cuantitativa y semicuantitativa (Figs 34a y 34b). Además, el NDGA produjo un incremento en los niveles proteicos de HO-1 de manera dosis y tiempo-dependiente (Figs 34c y 34d). El NDGA por sí solo (20 μ M durante 24 h) no alteró la viabilidad celular (Fig 36). En células PC12, el NDGA (10 μ M durante 6 h) también incrementó los niveles de HO-1 (Fig 34e).

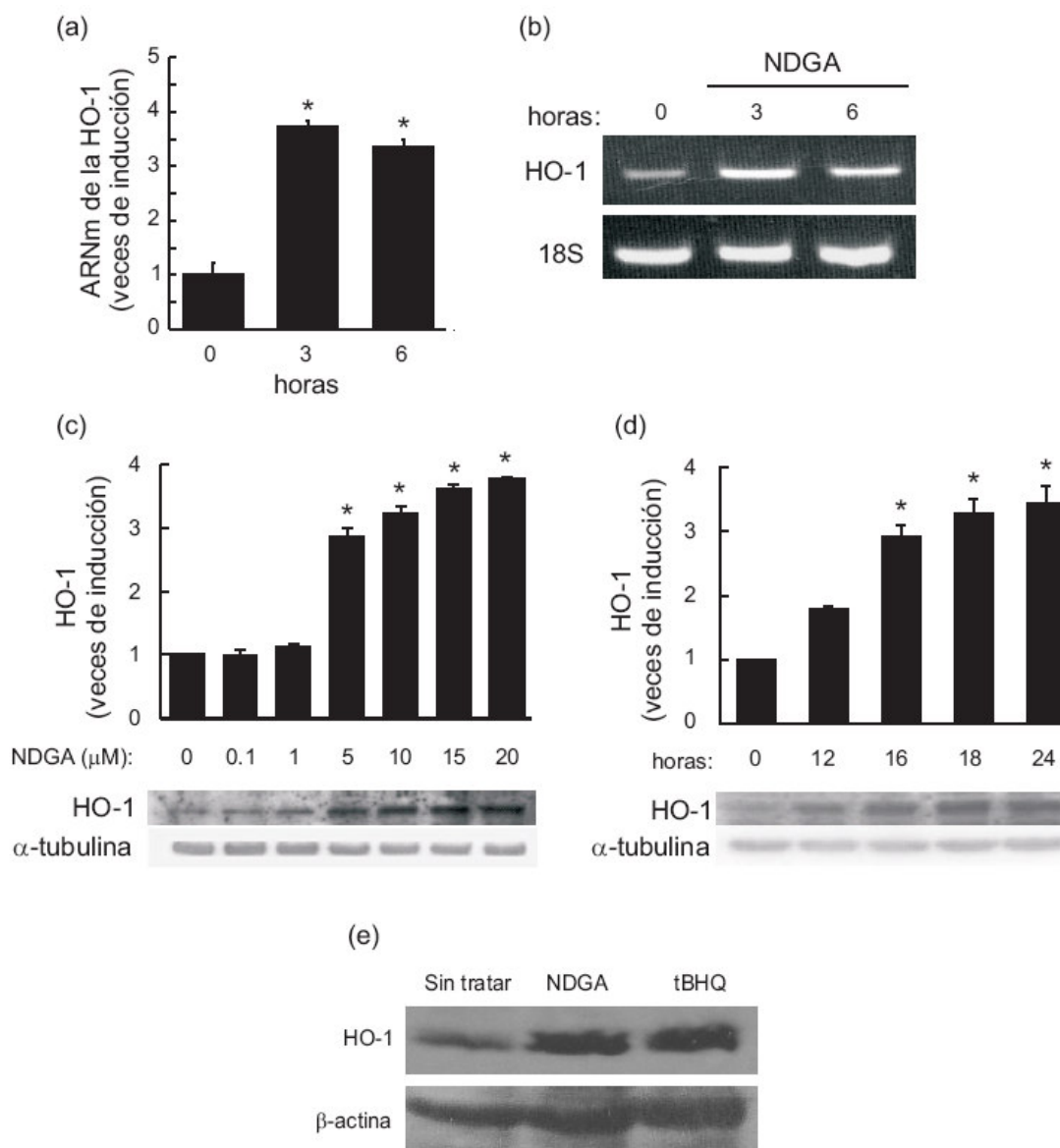


Figura 34. El NDGA incrementa los niveles de ARNm y de proteína de HO-1. (a) Los niveles de ARNm se evaluaron tras incubación con 20 μ M de NDGA durante 3 y 6 h mediante PCR a tiempo real (a) o PCR semicuantitativa (b). Panel superior: ARNm de HO-1. Panel inferior: ARNm de 18S, utilizado como control de carga. (c) Curva de dosis de NDGA (tras 16 h de incubación) y (d) curva de tiempo de NDGA (20 μ M). Paneles superiores: anti-HO-1. Paneles inferiores: anti- α -tubulina. (e) El NDGA incrementa los niveles de HO-1 en células PC12. Las células se incubaron con 10 μ M de NDGA o de tert-butil-hidroquinona (tBHQ) durante 6 h y posteriormente se analizaron los niveles de HO-1 por *immunoblot*. Panel superior: anti-HO-1. Panel inferior: anti- β -actina, mostrando una carga similar de proteína por cada calle. Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre los grupos indicados.

4.3.3. La inducción de HO-1 por el NDGA es dependiente de la actividad transcripcional de Nrf2.

Para analizar si la inducción de HO-1 por el NDGA era dependiente de Nrf2, utilizamos una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), procedentes del laboratorio del Dr. Itoh (Japón), preparados a partir de embriones de ratones C57/BL6 de 13,5 días de vida, como se describe en Materiales y Métodos. El NDGA (1, 3 y 10 μ M durante 16 h) incrementó los niveles de HO-1 de manera dosis-dependiente en los MEFs de ratones Nrf2^{+/+} (Figs 35a y 35c) pero apenas tuvo efecto sobre la expresión de HO-1 en los MEFs de ratones Nrf2^{-/-} (Figs 35b y 35c).

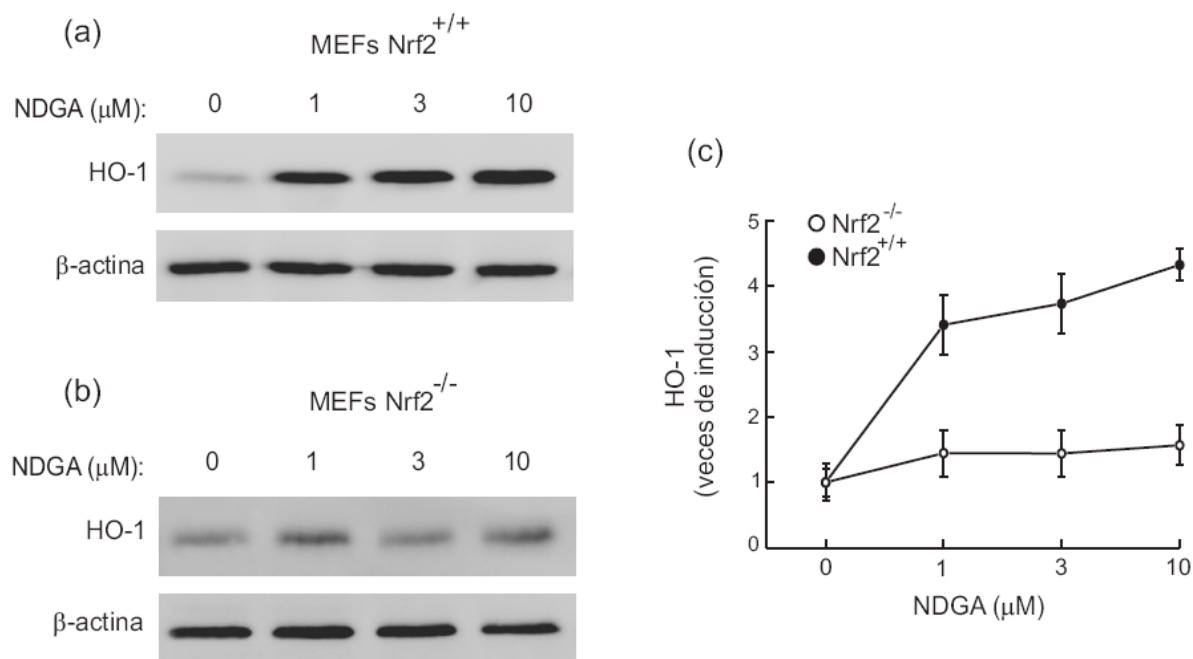


Figura 35. El NDGA necesita a Nrf2 para inducir la expresión de HO-1 en MEFs. (a) Niveles de HO-1 en MEFs de ratones Nrf2^{+/+} tratados con las concentraciones indicadas de NDGA durante 6 h. (b) Niveles de HO-1 en MEFs de ratones Nrf2^{-/-} tratados con las concentraciones indicadas de NDGA durante 6 h. Paneles superiores: anti-HO-1. Paneles inferiores: anti- β -actina, mostrando una carga similar de proteína por cada calle. (c) Cuantificación densitométrica de (a) y (b). Cada punto es la media de tres muestras \pm D.E.

4.3.4. El NDGA protege a las NGCs de la neurotoxicidad inducida por 3-NP y H₂O₂.

Mediante microscopía de contraste de fases los somas de las NGCs se ven redondos y negros, con un halo brillante y refringente alrededor de ellos, y con una red de neuritas bien definida. Después del daño inducido por el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), las neuronas en cultivo presentan una reducción en el número de somas oscuros y una mayor cantidad de neuritas finas y fragmentadas (Fig 36).

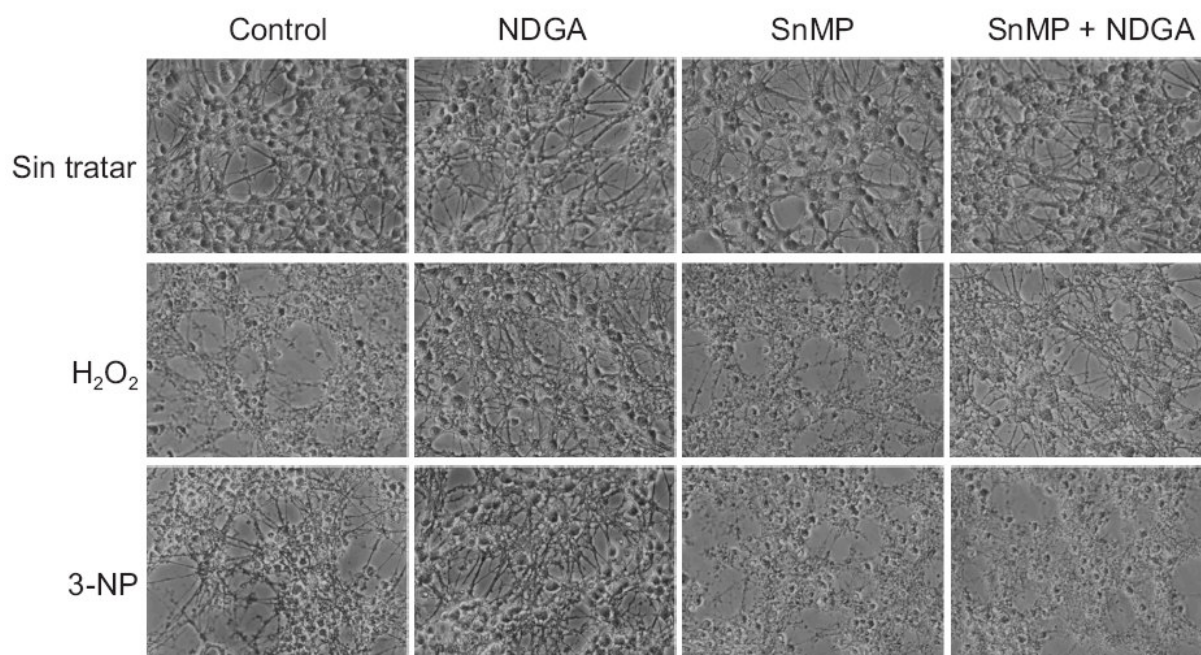


Figura 36. Fotografías de contraste de fases mostrando el efecto de 2 h de incubación con H_2O_2 o 3-NP en la morfología de NGCs pretratadas con NDGA o con el inhibidor de HO, SnMP. Las fotografías se tomaron 24 h después de la adición de los compuestos tóxicos. Las NGCs se incubaron con $10\ \mu\text{M}$ de NDGA durante 16 h, para incrementar los niveles de HO-1, tras este tiempo las células se trataron con $75\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 o 2 mM de 3-NP durante 2 h. La SnMP ($10\ \mu\text{M}$) se añadió 15 min antes de la incubación con los compuestos tóxicos y se añadió de nuevo tras retirarlos.

Estos datos son consistentes con los ensayos de MTT de la figura 37. La incubación de NGCs durante 2 h con 50 o $75\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 redujo la viabilidad celular al 48% y 23%, respectivamente (Fig 37a). La preincubación de las NGCs con $10\ \mu\text{M}$ de NDGA durante 16 h protegió frente a la pérdida de viabilidad celular inducida por ambas concentraciones de H_2O_2 (Fig 37a). De hecho, los somas se vieron intactos y las neuritas bien definidas (Fig 36). El NDGA también fue capaz de proteger a células PC12 de la toxicidad inducida por H_2O_2 , como se muestra en un ensayo de liberación de LDH (Fig 37c). El 3-NP (2 mM durante 2 h) también redujo la viabilidad celular de las NGCs al 57% (Figs 36 y 37b). Sin embargo, el pretratamiento con $10\ \mu\text{M}$ de NDGA durante 16 h atenuó la toxicidad inducida por este compuesto (Figs 36 y 37b).

Para determinar la relevancia de la HO-1 en el efecto protector del NDGA frente a H_2O_2 y 3-NP, utilizamos el inhibidor de HO, mesoporfirina de estaño (SnMP). Tanto la SnPP como la SnMP se fijan a la HO con más afinidad que el grupo hemo, inhibiendo su degradación. La SnMP por sí sola ($10\ \mu\text{M}$, 24 h) no alteró la reducción de MTT ($98,7 \pm 2,7\%$ del valor control) ni la morfología celular (Fig 36), pero sí que exacerbó el daño inducido por ambos compuestos, lo que demuestra que un nivel basal de HO es necesario en neuroprotección (Figs 36 y 37). Además, la SnMP bloqueó completamente el efecto protector del NDGA frente a H_2O_2 o 3-NP (Fig 37). Todos estos resultados indican que la HO-1 es necesaria por el NDGA para producir una respuesta protectora frente a estrés oxidativo.

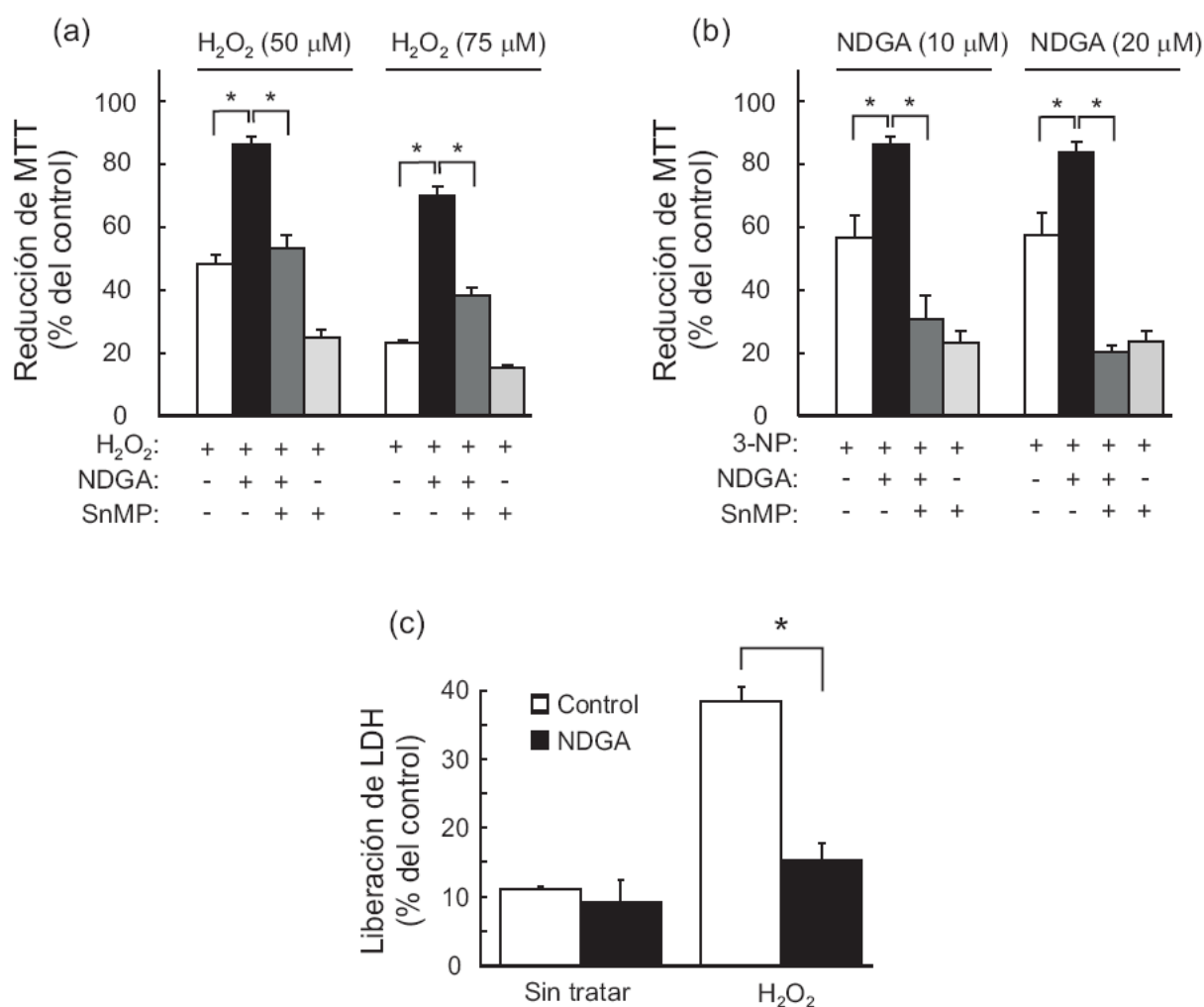


Figura 37. Efecto protector del NDGA en la toxicidad inducida por H₂O₂ o 3-NP. Las NGCs se incubaron con (a) 10 μM de NDGA o (b) 10 y 20 μM de NDGA durante 16 h. Después, el NDGA se retiró y las células se trataron con (a) 50 o 75 μM de H₂O₂ o (b) 2 mM de 3-NP durante 2 h. La SnMP (10 μM) se añadió 15 min antes del H₂O₂ o el 3-NP, y se añadió de nuevo tras retirarlos, para asegurarnos de que la actividad HO estaba inhibida. La reducción de MTT se determinó 24 h después de la exposición de las NGCs al H₂O₂ o 3-NP. (c) El NDGA protege a las células PC12 de la muerte celular inducida por H₂O₂. Las células se incubaron con 10 μM de NDGA durante 16 h y posteriormente se trataron con H₂O₂ (500 μM) durante 6 h, y se realizó el ensayo. Cada punto es la media de tres muestras ± D.E. Los asteriscos muestran diferencias significativas con una $p < 0,05$ entre los grupos indicados.

DISCUSIÓN

5.1. Señalización mediada por el receptor muscarínico M1.

En esta Tesis identificamos dos receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas abundantes en el cerebro que activan la vía antioxidante Nrf2/HO-1. En el caso del receptor M1, describimos el acoplamiento de la subunidad α_q de las proteínas G heterotriméricas a la fosfolipasa C- β , esta enzima rompe el fosfatidil-inositol 4-5 bisfosfato en diacil-glicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). El IP₃ libera a su vez calcio del retículo endoplasmático, lo cual activa a las proteínas quinasas C dependientes de calcio, como PKC- γ , una enzima abundante en la corteza y en el hipocampo. La activación de PKC lleva a la fosforilación e inhibición de la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β), una enzima implicada en numerosos procesos celulares y cuyas alteraciones en su regulación han sido relacionadas con procesos neurodegenerativos (Alvarez *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2004; Engel *et al.*, 2006). Por otro lado, el receptor purinérgico P2Y₁₃ activa la vía de PI3K/Akt a través de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas (Ortega *et al.*, 2008). En ambos casos, la activación del receptor es determinante para ejercer un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Adicionalmente, describimos la regulación farmacológica de Nrf2 por el compuesto fenólico ácido nordihidroguayarático (NDGA). El NDGA, además de activar la vía Nrf2/HO-1, actúa como un potente agente neutralizante de ROS (Floriano-Sanchez *et al.*, 2006).

En el caso del receptor muscarínico M1, vimos primero que el carbacol (Cch) incrementaba los niveles de HO-1 en neuronas de hipocampo y granulares de cerebelo (NGCs), que expresan el receptor M1. Como los cultivos primarios de neuronas representan una mezcla de varios tipos celulares (siendo las neuronas el tipo celular mayoritario) con variedad de receptores de acetilcolina, para estudiar la señalización desde M1 expresamos este receptor en células de feocromocitoma de rata, PC12. Esta línea celular mantiene muchas propiedades de las células neuroendocrinas y el grupo de receptores muscarínicos que expresa ha sido caracterizado en detalle (Michel *et al.*, 1989; Bonisch *et al.*, 1990; Berkeley *et al.*, 2000). Nuestros experimentos indican que estas células son apropiadas para estudiar la señalización desde M1 porque en células PC12 sin transfectar el Cch no indujo un incremento significativo en la expresión de HO-1 (Fig 15). Por el contrario, la expresión ectópica de M1 indujo un incremento en los niveles de HO-1 en presencia de Cch. Estas observaciones demuestran que las células PC12 son un sistema simple y apropiado para estudiar la señalización desde M1.

Además, estas observaciones complementan datos previos inicialmente desarrollados por el grupo del Dr. Sokolovsky, que analizó las funciones neurotróficas (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1992) y anti-apoptóticas (Lindenboim *et al.*, 1995) del receptor M1 en células PC12 que expresan de manera estable el receptor clonado M1. El grupo del Dr. Sokolovsky demostró que los agonistas muscarínicos Cch y oxotremorina inhiben la muerte celular por apoptosis de células PC12M1 aun en ausencia de factores de crecimiento, esenciales para la supervivencia de las PC12. Este efecto protector de los agonistas muscarínicos se observó tanto en células PC12M1 diferenciadas como sin diferenciar, se

bloqueó en presencia del antagonista muscarínico atropina, y no se observó en células PC12 que no expresan el receptor M1. Además de este efecto en la supervivencia, la oxotremorina indujo la inhibición de la síntesis de ADN y también la detención del crecimiento de células PC12M1 en crecimiento en las fases S y G₂/M del ciclo celular. Por tanto, los receptores muscarínicos en estas células podrían estar mediando la inhibición de la progresión del ciclo celular (Lindenboim *et al.*, 1995). Por otro lado, la diferenciación neuronal de las células PC12 está mediada por el factor de crecimiento nervioso (NGF), lo que conduce a un incremento en el número y longitud de las neuritas. Los agonistas muscarínicos inducen la expresión de genes para la diferenciación neuronal de las células PC12M1, funcionando como un factor de crecimiento en estas células (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1992).

Utilizando células PC12M1, Mangelus *et al* describieron un incremento de ROS inmediatamente después de la estimulación de M1. La activación del receptor M1 en estas células indujo la activación de Ras, ERK y p38. Estas vías de señalización fueron parcialmente bloqueadas cuando la producción de ROS se previno por el antioxidante N-acetil-cisteína. Otras señales inducidas por el receptor, como la activación de JNK o un incremento en la actividad transcripcional de factores de transcripción como NFκB o la proteína activadora AP-1 se inhibieron por el antioxidante dicumarol. La N-acetil-cisteína también inhibió la detención del crecimiento y los cambios en la forma celular inducidos por estimulación del receptor muscarínico en células PC12M1. Estos descubrimientos sugieren que las ROS actúan como segundos mensajeros en la señalización celular inducida por los receptores muscarínicos. La generación de ROS parece ser un evento temprano y crítico, que ocurre inmediatamente después de la estimulación del receptor muscarínico (Mangelus *et al.*, 2001). Investigaciones futuras determinarán si estas ROS producidas tempranamente podrían también participar como segundos mensajeros en la regulación de los AREs mediante disociación de la interacción entre Nrf2 y Keap1.

Hemos identificado a Gαq como un intermediario crucial en la señalización desde M1 hasta Nrf2. Otras proteínas Gα también pueden interaccionar con M1 y de hecho, el grupo del Dr. Cuadrado ha visto que Gα12 y Gα13 activan los AREs en células PC12, pero en menor medida que Gαq. Como un estudio previo relacionaba Gα12 y Gα13 con Nrf2 en un modelo tumorigénico (Cho *et al.*, 2007), centramos nuestro estudio en la relación todavía sin estudiar con Gαq. Las aproximaciones farmacológicas y genéticas llevaron a la conclusión de que M1 y Gαq utilizan la PLC-β y las PKCs clásicas para activar los AREs. Además, la queleritrina, un inhibidor específico de las PKCs, y el 2-APB, un bloqueante de la entrada de calcio en la célula, inhibieron la activación de los AREs por M1 y Gαq, mientras que la expresión de PLC-β y PKC-γ cooperó en su activación. En esta Tesis analizamos PKC-γ porque esta isoenzima es abundante en el cerebro y co-localiza con el receptor M1 en numerosos tipos neuronales. Además, nosotros y otros autores hemos observado la co-localización

del receptor M1 y de PKC- γ en el hipocampo (Tang *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2005), una zona del cerebro particularmente sensible al estrés oxidativo, como el originado por péptidos amiloidogénicos o por excitotoxicidad del glutamato. Sin embargo, nuestro estudio no excluye la contribución de otras PKCs clásicas en la regulación de los AREs, como PKC- α o PKC- β . De hecho, se ha descrito que la epigallocatequina, una catequina presente en el té verde, regula la expresión de HO-1 a través de la activación de la PKC novel PKC- δ y Nrf2 (Ogborne *et al.*, 2008).

Nuestro trabajo sugiere que M1 regula a Nrf2 mediante al menos dos mecanismos: estabilidad de la proteína, y localización subcelular. En cuanto a la estabilidad de la proteína, el mecanismo cuantitativamente más relevante parece ser la interacción con Keap1 (Kobayashi *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2006; Zhang, 2006). El hecho de que el Cch incrementara los niveles de Nrf2 (Figs 16d y 16e) y al mismo tiempo necesitara a las PKCs para la inducción de los AREs (Fig 18) sugiere que el incremento en los niveles de Nrf2 es mediado al menos en parte a través de la disociación del complejo Nrf2/Keap1 mediada por PKC. Se ha descrito que la fosforilación de Nrf2 en la serina 40, por un mecanismo dependiente de PKC, interfiere con Nrf2/Keap1, lo que lleva a la estabilización de Nrf2 (Rushworth *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Sin embargo, mientras que nuestros resultados también sugieren un papel en la estabilidad de Nrf2 mediado por PKC, la contribución específica de la fosforilación en la serina 40 no está clara en nuestro sistema, ya que el mutante S40A todavía fue capaz de inducir los AREs a través de M1.

En lo que se refiere a la localización subcelular, Nrf2 está continuamente sometido a un ciclo de entrada y salida del núcleo y en estudios previos, el grupo del Dr. Cuadrado ha demostrado que GSK-3 β excluye a Nrf2 del núcleo (Salazar *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2008b). Por lo tanto, el incremento en los niveles nucleares de Nrf2 tras la inducción de M1 (Fig 16f) junto con el hecho de que GSK-3 β bloqueara este efecto (Fig 21a) sugiere que la acumulación nuclear de Nrf2 requiere la inhibición de GSK-3 β . Numerosos estudios describen que las PKCs fosforilan a GSK-3 β en la serina 9, lo que lleva a su inactivación (Chen *et al.*, 2000; Ballou *et al.*, 2001; Garrido *et al.*, 2002). Algunos de estos estudios se realizaron en fracciones del cerebro enriquecidas con PKCs clásicas (Goode *et al.*, 1992) y con PKC- γ (Marais *et al.*, 1990; Goode *et al.*, 1992; Shin *et al.*, 2002). De acuerdo con estos estudios, la inhibición de PKC con queleritrina resultó en una reducción drástica en los niveles de fosfo-GSK-3 β -Ser9. Por lo tanto, la fosforilación de GSK-3 β mediada por PKC es un mecanismo plausible para inhibir a esta quinasa y para que Nrf2 se acumule en el núcleo.

Considerando que M1 puede utilizar diversas vías de señalización para activar a Nrf2, es interesante estimar la contribución relativa de la inhibición de GSK-3 β . El inhibidor de GSK-3 β , SB216763 activó por sí mismo y cooperó con el Cch para inducir el reportero ARE-LUC. Sin embargo, el hecho de que la inducción de los AREs por Cch y SB216763 fuera más fuerte que con

SB216763 solo, sugiere que el Cch activa otras vías de señalización que cooperan con la inhibición de GSK-3 β . Por tanto, en este sistema, la inhibición de GSK-3 β parece ser parte pero no el único mediador para la completa activación de Nrf2 a través de M1. Se necesita identificar en el futuro los mecanismos adicionales implicados en la señalización de M1 hasta Nrf2 y pueden incluir, además de una disociación directa de Nrf2-Keap1 por PKC, un papel de las vías de MAPK y de PI3K/Akt.

Evidencias recientes implican a GSK-3 β en la inducción de muerte celular y por tanto la inhibición de GSK-3 β se ha asociado con supervivencia bajo una variedad de condiciones citotóxicas asociadas al estrés oxidativo (Forlenza *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Balaraman *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). GSK-3 está implicada en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. Además, la disfunción colinérgica es una característica importante en esta enfermedad, y empieza a ocurrir en las primeras fases de la enfermedad (Davies *et al.*, 1976; Muir, 1997).

De manera paralela a estas evidencias se ha propuesto el uso de agonistas muscarínicos como una opción terapéutica. Esta Tesis proporciona una nueva razón para la utilización de agonistas selectivos del receptor M1 en las enfermedades neurodegenerativas, que como en el caso del Alzheimer, afectan a la neurodegeneración colinérgica. Dicho agonista debe tener más efecto antioxidante en la neurona post-sináptica, pero además, si M1 se comporta en algunas neuronas colinérgicas como un auto-receptor, entonces los agonistas de M1 proporcionarían un beneficio antioxidante adicional en la neurona pre-sináptica. Además, algunos productos de la reacción catalizada por la HO-1 son difusibles, como el CO, y podrían tener efectos paracrinos. Por tanto, además de restaurar la hipofunción colinérgica a través del receptor M1, y de reducir la deposición de A β y la patología asociada a tau, esta Tesis sugiere un papel adicional de los colinomiméticos en protección frente a estrés oxidativo a través de la activación de Nrf2.

El grupo del Dr. La Ferla, en 2006, investigó la eficacia terapéutica de un agonista del receptor muscarínico M1, AF267B, en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), que manifiesta progresivamente numerosas características de la enfermedad, incluyendo placas, ovillos, disfunción colinérgica y desórdenes cognitivos (Oddo *et al.*, 2003; Billings *et al.*, 2005; Oddo *et al.*, 2005). La administración de AF267B previno los déficits cognitivos a nivel espacial. El AF267B redujo las patologías de A β y de tau en el hipocampo y en la corteza, pero no en la amígdala. Se seleccionaron estas tres zonas porque en este modelo murino, las patologías de A β y de tau son más graves en estas localizaciones. El mecanismo por el cual se redujo la deposición de A β fue debido a la activación selectiva de ADAM17, una enzima α -secretasa que lleva al procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica, mientras que la reducción de la patología de tau fue mediado por una disminución en la actividad de GSK-3 β . El hecho de que el AF267B no tuviera efectos en la amígdala se atribuye a la baja expresión de la enzima ADAM17 en dicha localización, y no a la expresión de

receptores M1, que es similar en el hipocampo, corteza y amígdala. Además, la administración de dicitolmina (DCC), el antagonista selectivo del receptor M1, exacerbó las patologías asociadas a A β y a tau. En conclusión, el uso de agonistas del receptor M1, como el AF267B, producen una atenuación de las principales características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer y revierten los déficits en la cognición. Por tanto, dichos agonistas podrían ser eficaces en el tratamiento de esta enfermedad (Caccamo *et al.*, 2006).

5.2. Señalización mediada por el receptor purinérgico P2Y₁₃.

En el caso del receptor purinérgico P2Y₁₃, vimos que el ADP y su análogo 2MeSADP inducían la respuesta antioxidante celular a través del eje Nrf2/HO-1. Además el 2MeSADP, actuando sobre el receptor P2Y₁₃, protegió frente a la muerte celular inducida por H₂O₂ en NGCs de rata y de ratón. Tanto Nrf2 como HO-1 fueron esenciales en esta protección porque la ausencia genética de Nrf2 o la inhibición farmacológica de HO-1 bloquearon este efecto neuroprotector.

Cuando buscamos el receptor P2Y específico responsable de la protección antioxidante, el 2MeSADP restringe opciones al P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ (Carrasquero *et al.*, 2005). En las NGCs el receptor P2Y₁₂ apenas se expresa (Fig 25b). El 2MeSADP y el ADP indujeron la expresión de HO-1 a concentraciones similares, por tanto sugiriendo un papel del receptor P2Y₁₃, ya que ambos actúan sobre este receptor con una potencia similar (Communi *et al.*, 2001; Fumagalli *et al.*, 2004). Además, para discriminar entre los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃ utilizamos antagonistas, MRS2179 y MRS2211, respectivamente. Como una aproximación alternativa, utilizamos el inhibidor de la proteína G α i, la toxina pertussis, que interfiere selectivamente con el receptor acoplado a G α i, P2Y₁₃. Es interesante que tanto el MRS2211 como la toxina pertussis bloquearon casi en su totalidad la inducción de HO-1 por el 2MeSADP. Además, la expresión ectópica del receptor P2Y₁₃ en células de neuroblastoma N2A activó los AREs del promotor del gen *Hmox1* en presencia de 2MeSADP. Por tanto, mientras que no podemos excluir completamente el papel de otros receptores P2Y, nuestros datos genéticos y farmacológicos son consistentes con un papel muy relevante del receptor P2Y₁₃ en la inducción de la respuesta neuroprotectora mediada por Nrf2/HO-1.

En la misma línea, también se ha descrito que el ATP y el 2MeSADP protegen frente a la muerte celular de astrocitos inducida por H₂O₂. En este caso, el efecto fue mediado por un receptor acoplado a la proteína G α q P2Y₁ a través de la regulación de genes de oxido-reductasas implicados en acciones antioxidantes (Shinozaki *et al.*, 2005). En este estudio se demuestra que el ATP, pero no la adenosina, protege frente a la muerte celular de cultivos de astrocitos inducida por H₂O₂. El ATP redujo la muerte celular de los astrocitos de manera dependiente del tiempo y de la dosis. La protección mediada por ATP se inhibió en presencia de antagonistas de los receptores P2, y se revirtió en presencia de agonistas del receptor P2Y₁, pero no en presencia de adenosina. El inhibidor de la síntesis de

proteínas, cicloheximida, también bloqueó dicha protección. En el análisis mediante microarrays, el ATP indujo la expresión de varios genes de oxido-reductasas, como la tioredoxina reductasa (TrxR) o la carbonil-reductasa. Por tanto, el ATP, actuando sobre los receptores P2Y₁, acoplados a Gαq/11, induce la expresión de genes de oxido-reductasas, llevando a la protección de astrocitos frente a H₂O₂. Así mismo, la protección de los astrocitos por 2MeSADP se inhibió en presencia de un quelante de calcio intracelular y de un bloqueante de la PLC-β, indicando la implicación de señales intracelulares de calcio a través de la activación de P2Y₁-Gαq/Gα11, de manera similar a lo descrito para el receptor muscarínico M1 (Espada *et al.*, 2009).

El receptor P2Y₁₃ es un receptor acoplado a la proteína Gαi que responde al ADP (Communi *et al.*, 2001). En contextos diferentes a la transmisión purinérgica, otros grupos han descrito también la inducción del eje Nrf2/HO-1 por algunos receptores acoplados a proteínas G. Por ejemplo, Gα12 y Gα13 transmiten una señal dependiente de JNK para la ubiquitinación de Nrf2, mientras que Gα13 regula la fosforilación de Nrf2 mediada por Rho-PKC-δ, que a su vez está regulada negativamente por Gα12 (Cho *et al.*, 2007). De manera similar, el receptor acoplado a proteínas G del herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi (vGPCR) induce la expresión de HO-1 a través de Gα12/13 y la proteína G monomérica RhoA (Marinissen *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007).

Esta Tesis proporciona la primera demostración de que las proteínas G heterotriméricas del tipo Gαi pueden activar a Nrf2 e inducir la expresión de HO-1. Nuestro trabajo sugiere que el receptor P2Y₁₃ es diana de Nrf2 mediante al menos dos mecanismos: estabilidad de la proteína, y localización subcelular (Fig 27). Las vías de señalización específicas implicadas en la regulación de Nrf2 por este receptor necesitan ser caracterizadas, pero sabemos que numerosas proteínas quinasas podrían fosforilar a Nrf2, lo que llevaría a su estabilización y translocación nuclear.

Resultados previos del grupo de la Dra. Miras-Portugal indican que el 2MeSADP es capaz de activar la vía de PI3K/Akt, llevando a la fosforilación e inhibición de la actividad catalítica de GSK-3β (Ortega *et al.*, 2008). La PTX bloqueó el efecto de PI3K/Akt sobre GSK-3β de manera similar a cómo bloqueó la inducción de HO-1 en este estudio. Como ya hemos mencionado anteriormente, Nrf2 es fosforilado por GSK-3β y sacado del núcleo (Salazar *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2008a; Rojo *et al.*, 2008b). Además, trabajos aún no publicados del grupo del Dr. Cuadrado indican que GSK-3β marca a Nrf2 para degradación proteolítica (Rada y Cuadrado). Por tanto, proponemos que la reducción en la actividad de GSK-3β a través de la vía P2Y₁₃/PI3K/Akt podría llevar a la liberación del efecto de GSK-3β sobre Nrf2.

Existen numerosos ejemplos del acoplamiento de la vía PI3K/Akt a la señalización mediada por los receptores metabotrópicos P2Y, y en particular a los receptores de ADP. Por ejemplo, la activación

del receptor P2Y₁ induce la proliferación de fibroblastos adventiciales por medio de la activación de múltiples vías, como la de PI3K/Akt (Gerasimovskaya *et al.*, 2005), y el P2Y₂, por su parte, es capaz de activar Akt por un mecanismo dependiente de PDK-1 en células mesangiales de rata (Huwiler *et al.*, 2002). En otros estudios, el receptor P2Y₁₂, activando a través de G α i una vía dependiente de PLC/PI3K/Akt, induce la quimiotaxis microglial hacia la zona de daño celular (Irino *et al.*, 2008). Por último, en las células de glioma C6, los receptores P2Y₁ activan la PLC- β vía G α q/G11/12, mientras que el P2Y₁₂ activa la vía PI3K/Akt a través de un mecanismo de cross-talk con el receptor de IGF-I (Czajkowski *et al.*, 2004; Van Kolen *et al.*, 2004; Van Kolen *et al.*, 2006a).

La co-expresión de varios receptores de ADP está descrita en muchos tipos celulares, lo que parece ser una pauta común para esta familia de receptores. En las células dendríticas, por ejemplo, el receptor P2Y₁₃ coexiste con otro receptor de ADP aún no identificado (Marteau *et al.*, 2004). También se ha descrito la co-expresión de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃ en los astrocitos cerebelosos, estando su señalización acoplada a la fosforilación de ERK y a la movilización de calcio intracelular (Carrasquero *et al.*, 2005). Por otro lado, los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ están también co-expresados en las células de glioma C6 junto con una gran variedad de otros receptores metabotrópicos P2Y (Nicholas *et al.*, 1996; Tu *et al.*, 2000; Czajkowski *et al.*, 2002a; Czajkowski *et al.*, 2002b).

Además de estas evidencias, la co-expresión de receptores de ADP conduce, generalmente, al cruce e interacción de las vías de señalización activadas por ellos. Un buen ejemplo lo tenemos en las plaquetas, donde los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ interaccionan recíprocamente. El P2Y₁₂ potencia la respuesta de calcio inducida por el P2Y₁ a través de la PI3K y la inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que el P2Y₁ inhibe la señal del P2Y₁₂ a través de la activación de las quinasas Src (Hardy *et al.*, 2004). Igualmente, estos dos receptores interaccionan en las células de astrocitoma humano 1321N1, donde el P2Y₁ potencia la apoptosis mediada por el TNF α , mientras que el P2Y₁₂ la atenúa, por medio de una vía de señalización dependiente de PLC/PKC/ERK (Mamedova *et al.*, 2006). Por lo tanto, no podemos descartar la posible interacción entre los receptores P2Y₁₃ y el P2Y₁ en nuestro modelo, que será objeto de estudio en un futuro.

Poco se sabe sobre la función específica de cada receptor P2Y, incluyendo el P2Y₁₃. En hepatocitos humanos este receptor participa en el control de la endocitosis de las HDL por un mecanismo que implica la vía de RhoA/ROCK I (Jacquet *et al.*, 2005; Malaval *et al.*, 2009). Como comentamos anteriormente, se ha descrito que el receptor P2Y₁₃ está acoplado a GSK-3 β en NGCs, e implicado en la translocación nuclear del factor de transcripción β -catenina (Ortega *et al.*, 2008). En un modelo relacionado de astrocitos de cerebelo, los receptores P2Y₁₃ participan en la regulación del receptor ionotrópico P2X₇, siendo responsable del componente metabotrópico de las respuestas de calcio producidas por este receptor ionotrópico (Carrasquero *et al.*, 2009). Sin embargo, en esta Tesis se demuestra por primera vez el papel del receptor P2Y₁₃ en protección de neuronas frente a estrés

oxidativo y abre una nueva puerta a la regulación de la respuesta antioxidante mediada por Nrf2/HO-1 a través de agonistas del receptor P2Y₁₃ en enfermedades neurodegenerativas, en las que el estrés oxidativo es un responsable importante de la muerte celular.

Los receptores P2Y podrían tener también una utilidad terapéutica en el tratamiento del dolor, la epilepsia, o en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson o Huntington (Fischer *et al.*, 2007). En este sentido es interesante mencionar un estudio realizado en células 1321N1 transfectadas con el receptor P2Y₂ humano, en las se incrementó el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) por la vía no amiloidogénica de una forma dependiente de calcio extracelular e independiente de la movilización de calcio intracelular y de PKC. El producto, sAPP α , contribuyó a la viabilidad neuronal (Camden *et al.*, 2005). Otras investigaciones hechas *in vivo* demuestran que el ATP extracelular modula la transmisión dopaminérgica en el Sistema Nervioso Central. El ATP y el 2MeSATP estimulan la liberación de dopamina de las neuronas nigroestriatales del estriado (Zhang *et al.*, 1995) y de las neuronas ventrales tegmentales, en su región de origen y en su región diana (núcleus accumbens) (Krugel *et al.*, 2001) a través de receptores P2Y. La administración de PPADS y de MRS2179, antagonistas del receptor P2Y₁, reduce la concentración extracelular de dopamina, sugiriendo que la liberación tónica de dopamina es regulada de una manera fisiológicamente relevante a través de los receptores P2Y₁.

Sin embargo, también se observan frecuentemente cambios en la expresión de receptores purinérgicos en diferentes tipos celulares y tejidos, no sólo debido a la maduración y diferenciación neuronal, sino también debido a varias condiciones patológicas (Franke *et al.*, 2006). Así, el ATP puede modular la plasticidad de las redes de astrocitos bajo condiciones normales, pero también durante procesos fisiopatológicos como la hipoxia, isquemia y diversos daños al Sistema Nervioso Central (Cotrina *et al.*, 2000; Arcuino *et al.*, 2002), por lo que en este caso los antagonistas selectivos de los receptores P2Y podrían ser importantes agentes neuroprotectores en algunas patologías (Franke *et al.*, 2006).

5.3. Activación farmacológica del eje Nrf2/HO-1 por el NDGA.

Dado que la activación de Nrf2/HO-1 por receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas produjo una disminución de la muerte celular originada por el estrés oxidativo, en el tercer capítulo experimental de esta Tesis nos planteamos la posibilidad de regular esta vía citoprotectora mediante la utilización de nuevos compuestos que afecten a la activación de Nrf2 y tengan un valor neuroprotector en enfermedades que se caracterizan por la presencia de estrés oxidativo, como las enfermedades neurodegenerativas. Nos parece muy importante analizar estos nuevos compuestos con un valor citoprotector porque en estos momentos las estrategias terapéuticas disponibles no aportan un beneficio significativo para frenar la neurodegeneración. Entre estos compuestos centramos nuestra

atención en el ácido norhidroguayarático (NDGA), un polifenol con propiedades antioxidantes que se encuentra en altas concentraciones en las hojas del chaparral (*Larrea tridentata*), un arbusto que crece en algunas áreas desérticas del suroeste de EEUU y del norte de México (Arteaga *et al.*, 2005). Algunos de los efectos beneficiosos del NDGA se han atribuido a sus propiedades antioxidantes. De hecho, el NDGA es un potente agente neutralizante *in vitro* de oxígeno singlete, radical hidroxilo y ácido hipocloroso (Floriano-Sanchez *et al.*, 2006).

Estudios realizados en el grupo del Dr. Pedraza-Chaverri demuestran que el NDGA es capaz de reducir los efectos tóxicos de varios compuestos debido a estas propiedades antioxidantes intrínsecas. Así, el NDGA atenuó la toxicidad inducida por iodoacetato (IAA), un inhibidor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en NGCs, sin bloquear el efecto del IAA sobre la actividad GAPDH. Además, el NDGA previno el efecto inhibitor del IAA sobre la actividad aconitasa, un marcador de estrés oxidativo, lo que sugirió que el efecto protector del NDGA en la neurotoxicidad inducida por IAA se asoció con la prevención de la producción de estrés oxidativo (Cardenas-Rodriguez *et al.*, 2009). El NDGA también redujo la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio, un inductor de estrés oxidativo, en ratas (Yam-Canul *et al.*, 2008).

En esta Tesis presentamos nuevos descubrimientos que demuestran que el NDGA es un potente inductor de la vía antioxidante Nrf2/HO-1, y ejerce un efecto citoprotector frente a un inductor genérico de estrés oxidativo, el H₂O₂, y una toxina que inhibe el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, el 3-NP, en cultivos primarios de NGCs. Los efectos tóxicos del 3-NP en el Sistema Nervioso Central se deben a la inhibición irreversible de la succinato deshidrogenasa en la cadena respiratoria mitocondrial, dañando directamente el metabolismo energético e induciendo estrés oxidativo a través de una reducción incompleta del oxígeno (Alexi *et al.*, 1998).

Nosotros proponemos que el efecto protector observado en las células tratadas con NDGA es debido principalmente a su capacidad para inducir HO-1 y no a su actividad antioxidante intrínseca. Esta afirmación está basada en el hecho de que el efecto protector del NDGA se revirtió en presencia de mesoporfirina de estaño (SnMP), sugiriendo que dicho efecto está mediado por un mecanismo distinto de las propiedades intrínsecas antioxidantes del NDGA, que implica la inducción de HO-1. De hecho, numerosos estudios han demostrado que la inducción de HO-1 representa una respuesta adaptativa que incrementa la resistencia celular al daño oxidativo (Salinas *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2004; Abraham *et al.*, 2008; Cuadrado *et al.*, 2008). Esta protección está mediada probablemente por un efecto antioxidante de la biliverdina y la bilirrubina y por las acciones citoprotectoras del CO (Alcaraz *et al.*, 2008). La inducción de HO-1 mediada por el NDGA se asoció con la capacidad del NDGA para producir la translocación nuclear de Nrf2 y para incrementar la actividad luciferasa, sugiriendo que el NDGA está activando la vía antioxidante Nrf2/ARE. Estos nuevos descubrimientos sugieren que el NDGA pertenece al grupo de antioxidantes naturales fenólicos que, no sólo atrapan las

ROS, sino que también inducen la expresión de genes antioxidantes y citoprotectores, como el de la HO-1, a través de la vía Nrf2/HO-1.

En este contexto, algunos antioxidantes naturales, incluyendo la curcumina (Balogun *et al.*, 2003) y el carnosol (Martin *et al.*, 2004) ejercen efectos protectores no sólo atrapando las ROS, sino también induciendo la expresión de HO-1. El carnosol atenúa el estrés oxidativo en células PC12 porque induce la expresión de HO-1 a través de la vía de PI3K/Akt (Martin *et al.*, 2004). Sin embargo, este compuesto no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

Por otro lado, la curcumina es un colorante natural procedente de la cúrcuma (*Cúrcuma longa*), una planta herbácea que crece en zonas áridas de India y de Polinesia, con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticarcinogénicas, antiinfecciosas e hipocolesterolémicas (Shishodia *et al.* 2005, Chen *et al.*, 2006) y en su estructura posee dos anillos fenólicos al igual que el NDGA (Figs 39a y 39b). La curcumina cruza la barrera hematoencefálica y tiene efectos neuroprotectores frente a estrés oxidativo. Además, de manera similar al NDGA, actúa como un potente agente neutralizante (Ak *et al.*, 2008). También induce la vía Nrf2/HO-1 (Yang *et al.* 2009; Bao *et al.* 2010). La curcumina es capaz de revertir los efectos neurotóxicos de una variedad de metales, como el cadmio, arsénico, mercurio, etc, en el cerebro de roedores (Gupta *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2010). Así mismo, protege del daño neurotóxico de numerosos compuestos, por ejemplo, el 3-NP. En un estudio hecho en el cerebro de ratas, la administración intraperitoneal de 3-NP (20 mg/kg durante cuatro días) produjo una pérdida de peso y de memoria en las ratas, e incrementó el estrés oxidativo (peroxidación lipídica, niveles de GSH reducidos, etc) en el cerebro. El tratamiento crónico con curcumina (10, 20 y 50 mg/kg) una vez durante un período de ocho días, empezando cuatro días antes de la administración del 3-NP, mejoró los déficits motores y cognitivos en las ratas. Además, la curcumina disminuyó el estrés oxidativo inducido por 3-NP en el cerebro. También restauró de manera significativa la disminución en la actividad succinato deshidrogenasa (Kumar *et al.*, 2007).

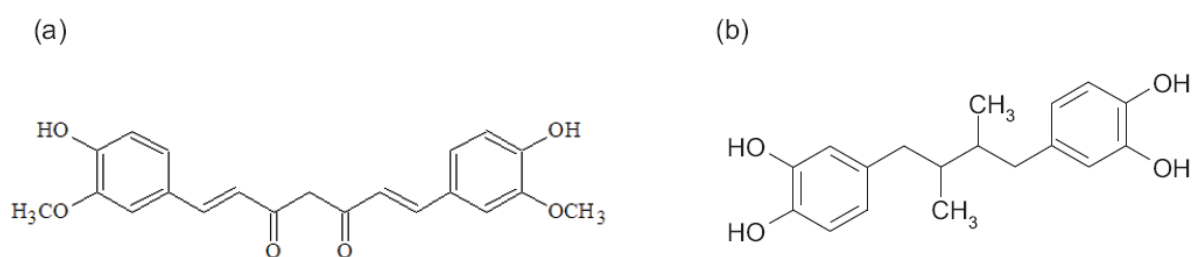


Figura 39. Estructuras de la curcumina (a) y del NDGA (b).

Se ha descrito que la curcumina es capaz de revertir los déficits motores en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer (Tg2576), basado en la expresión de APP humano portador de la mutación sueca. La aumentada peroxidación lipídica y la pérdida de neuronas en la médula espinal de estos ratones se suprimieron parcialmente por la curcumina. La reducción y desmielinización de las fibras de los nervios ciáticos también se revirtieron parcialmente por la curcumina (Seo *et al.*, 2010).

Así mismo, la curcumina tiene efectos neuroprotectores frente a la toxina parkinsoniana MPTP. La administración intraperitoneal sistémica de curcumina (80 mg/kg), y de su metabolito, tetrahidrocurcumina (60 mg/kg) en ratones revirtió significativamente la depleción en dopamina y DOPAC inducidos por MPTP en el estriado, lo que fue debido en parte a la inhibición de la actividad de la monoamino oxidasa-B (MAO-B), una enzima que degrada la dopamina (Rajeswari *et al.* 2008). En otro estudio realizado *in vitro*, la curcumina redujo la toxicidad inducida por alfa-sinucleína en células dopaminérgicas SH-SY5Y, redujo los niveles de ROS y protegió a las células frente a la apoptosis inducida por estas ROS (Wang *et al.*, 2010).

Trabajos futuros determinarán si el NDGA puede cruzar la barrera hematoencefálica y conseguir una biodisponibilidad suficiente en el cerebro. En este sentido es muy interesante un estudio reciente sobre la utilización del NDGA como neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer. En este estudio, se analizaron los efectos de varios compuestos fenólicos en el modelo murino Tg2576. A estos ratones se les administró en la dieta diferentes compuestos fenólicos, entre ellos el NDGA, durante un período de 10 meses desde los 5 meses de vida. En el grupo tratado con NDGA, los depósitos de A β disminuyeron significativamente en el cerebro, como se confirmó mediante inmunohistoquímica. La administración de los compuestos fenólicos en los ratones previno la patología de la enfermedad de Alzheimer afectando a diferentes vías de agregación de A β (Hamaguchi *et al.*, 2009).

Todos estos datos aportan nuevas formas de regulación farmacológica de la vía antioxidante Nrf2/HO-1 mediante la utilización del NDGA, y lo señalan como un buen candidato para inducir una respuesta neuroprotectora en el cerebro y frenar el estrés oxidativo que caracteriza a las enfermedades neurodegenerativas, actuando por un lado a través de la activación de Nrf2 y por otro frenando directamente la producción de ROS.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, muscarínico M1 y purinérgico P2Y₁₃, inducen la expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1), tanto en líneas celulares como en cultivos primarios de neuronas.
- 2.- Dichos receptores utilizan al factor de transcripción Nrf2 para inducir la expresión de HO-1. Esta regulación de Nrf2 viene mediada por al menos dos mecanismos: estabilidad de la proteína, y localización subcelular.
- 3.- La inducción de HO-1 por estos receptores protege frente al estrés oxidativo y la muerte celular generados por toxinas como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).
- 4.- El ácido nordihidroguayarático (NDGA) activa la vía Nrf2/HO-1 en células PC12, fibroblastos embrionarios y neuronas granulares de cerebelo (NGCs).
- 5.- El NDGA es capaz de proteger frente al estrés oxidativo generado por el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Este efecto se previene por el inhibidor de hemo oxigenasa, mesoporfirina de estaño (SnMP).
- 6.- La inducción de la vía Nrf2/HO-1 mediada por agonistas de los receptores M1 y P2Y₁₃ y por el NDGA puede tener valor terapéutico frente al estrés oxidativo que caracteriza a varias enfermedades neurodegenerativas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio, M.P., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A., and Burnstock, G. (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24, 52-55.
- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., and Weisman, G.A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281-341.
- Abraham, N.G., and Kappas, A. (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 60, 79-127.
- Adibhatla, R.M., and Hatcher, J.F. (2008). Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem* 49, 241-268.
- Agarwal, R., Goel, S.K., and Behari, J.R. Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *J Appl Toxicol*.
- Ak, T., and Gulcin, I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact* 174, 27-37.
- Alcaraz, M.J., Guillen, M.I., Ferrandiz, M.L., Megias, J., and Motterlini, R. (2008). Carbon monoxide-releasing molecules: a pharmacological expedient to counteract inflammation. *Curr Pharm Des* 14, 465-472.
- Alexi, T., Hughes, P.E., Faull, R.L., and Williams, C.E. (1998). 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *Neuroreport* 9, R57-64.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E., and Diaz-Nido, J. (1999). Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453, 260-264.
- Amersi, F., Shen, X.D., Anselmo, D., Melinek, J., Iyer, S., Southard, D.J., Katori, M., Volk, H.D., Busuttil, R.W., Buelow, R., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002). Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 35, 815-823.
- Apopa, P.L., He, X., and Ma, Q. (2008). Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol* 22, 63-76.
- Arai, K., Maruyama, Y., Nishida, M., Tanabe, S., Takagahara, S., Kozasa, T., Mori, Y., Nagao, T., and Kurose, H. (2003). Differential requirement of G α ₁₂, G α ₁₃, G α _q, and G β for endothelin-1-induced c-Jun NH₂-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Pharmacol* 63, 478-488.
- Arcuino, G., Lin, J.H., Takano, T., Liu, C., Jiang, L., Gao, Q., Kang, J., and Nedergaard, M. (2002). Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9840-9845.

- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., and Cardenas, R. (2005). Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol* 98, 231-239.
- Balaraman, Y., Limaye, A.R., Levey, A.I., and Srinivasan, S. (2006). Glycogen synthase kinase 3beta and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell Mol Life Sci* 63, 1226-1235.
- Baldwin, J.M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 180-190.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C.J., Foresti, R., Alam, J., and Motterlini, R. (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371, 887-895.
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W., and Vercellotti, G.M. (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267, 18148-18153.
- Ballou, L.M., Tian, P.Y., Lin, H.Y., Jiang, Y.P., and Lin, R.Z. (2001). Dual regulation of glycogen synthase kinase-3beta by the alpha1A-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 276, 40910-40916.
- Bao, W., Li, K., Rong, S., Yao, P., Hao, L., Ying, C., Zhang, X., Nussler, A., and Liu, L. Curcumin alleviates ethanol-induced hepatocytes oxidative damage involving heme oxygenase-1 induction. *J Ethnopharmacol* 128, 549-553.
- Baranano, D.E., and Snyder, S.H. (2001). Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10996-11002.
- Barrera, D., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Hernandez-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.E., and Pedraza-Chaverri, J. (2003). Protective effect of SnCl2 on K2Cr2O7-induced nephrotoxicity in rats: the indispensability of HO-1 preinduction and lack of association with some antioxidant enzymes. *Life Sci* 73, 3027-3041.
- Berkeley, J.L., and Levey, A.I. (2000). Muscarinic activation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cells. *J Neurochem* 75, 487-493.
- Bhat, R.V., Budd Haeberlein, S.L., and Avila, J. (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89, 1313-1317.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., and LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675-688.
- Blank, V. (2008). Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J Mol Biol* 376, 913-925.
- Bloom, D.A., and Jaiswal, A.K. (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response

- element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* 278, 44675-44682.
- Boehning, D., Moon, C., Sharma, S., Hurt, K.J., Hester, L.D., Ronnett, G.V., Shugar, D., and Snyder, S.H. (2003). Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron* 40, 129-137.
- Bonisch, H., Boer, R., Dobler, M., and Schudt, C. (1990). Pharmacological characterization of muscarine receptors of PC12 (rat pheochromocytoma) cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 341, 158-164.
- Bonner, T.I. (1989). The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci* 12, 148-151.
- Brambilla, R., Neary, J.T., Cattabeni, F., Cottini, L., D'Ippolito, G., Schiller, P.C., and Abbracchio, M.P. (2002). Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling. *J Neurochem* 83, 1285-1296.
- Brune, B., and Ullrich, V. (1987). Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 32, 497-504.
- Buckley, N.J., Hulme, E.C., and Birdsall, N.J. (1990). Use of clonal cell lines in the analysis of neurotransmitter receptor mechanisms and function. *Biochim Biophys Acta* 1055, 43-53.
- Bulmer, A.C., Ried, K., Blanchfield, J.T., and Wagner, K.H. (2008). The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res* 658, 28-41.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509-581.
- Burnstock, G. (2004). Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem* 4, 793-803.
- Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16, 433-440.
- Caccamo, A., Oddo, S., Billings, L.M., Green, K.N., Martinez-Coria, H., Fisher, A., and LaFerla, F.M. (2006). M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49, 671-682.
- Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Gagliani, M.C., de Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., and Lohse, M.J. (2009). Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* 7, e1000172.
- Camden, J.M., Schrader, A.M., Camden, R.E., Gonzalez, F.A., Erb, L., Seye, C.I., and Weisman, G.A. (2005). P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 280, 18696-18702.
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., and Gierschik, P. (1992). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* 360, 684-686.

- Cardenas-Rodriguez, N., Guzman-Beltran, S., Medina-Campos, O.N., Orozco-Ibarra, M., Massieu, L., and Pedraza-Chaverri, J. (2009). The effect of nordihydroguaiaretic acid on iodoacetate-induced toxicity in cultured neurons. *J Biochem Mol Toxicol* 23, 137-142.
- Carrasquero, L.M., Delicado, E.G., Bustillo, D., Gutierrez-Martin, Y., Artalejo, A.R., and Miras-Portugal, M.T. (2009). P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes. *J Neurochem* 110, 879-889.
- Carrasquero, L.M., Delicado, E.G., Jimenez, A.I., Perez-Sen, R., and Miras-Portugal, M.T. (2005). Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors. *Purinergic Signal* 1, 153-159.
- Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., and Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2-5.
- Communi, D., Gonzalez, N.S., Detheux, M., Brezillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., and Boeynaems, J.M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* 276, 41479-41485.
- Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M., and Boeynaems, J.M. (1997). Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 272, 31969-31973.
- Converso, D.P., Taille, C., Carreras, M.C., Jaitovich, A., Poderoso, J.J., and Bockowski, J. (2006). HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J* 20, 1236-1238.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H., Lopez-Garcia, J.C., Naus, C.C., and Nedergaard, M. (2000). ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci* 20, 2835-2844.
- Cruse, I., and Maines, M.D. (1988). Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem* 263, 3348-3353.
- Cuadrado, A., and Rojo, A.I. (2008). Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Curr Pharm Des* 14, 429-442.
- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W., and Diehl, J.A. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 24, 8477-8486.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 23, 7198-7209.
- Czajkowski, R., Banachewicz, W., Ilnytska, O., Drobot, L.B., and Baranska, J. (2004). Differential effects of P2Y1 and P2Y12 nucleotide receptors on ERK1/ERK2 and phosphatidylinositol 3-kinase signalling and cell proliferation in serum-deprived and nonstarved glioma C6 cells. *Br J Pharmacol* 141, 497-507.
- Czajkowski, R., and Baranska, J. (2002a). Cross-talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signalling pathways in glioma C6 cells. *Acta Biochim Pol* 49, 877-889.

- Czajkowski, R., Lei, L., Sabala, P., and Baranska, J. (2002b). ADP-evoked phospholipase C stimulation and adenylyl cyclase inhibition in glioma C6 cells occur through two distinct nucleotide receptors, P2Y(1) and P2Y(12). *FEBS Lett* 513, 179-183.
- Chambers, J.K., Macdonald, L.E., Sarau, H.M., Ames, R.S., Freeman, K., Foley, J.J., Zhu, Y., McLaughlin, M.M., Murdock, P., McMillan, L., Trill, J., Swift, A., Aiyar, N., Taylor, P., Vawter, L., Naheed, S., Szekeres, P., Hervieu, G., Scott, C., Watson, J.M., Murphy, A.J., Duzic, E., Klein, C., Bergsma, D.J., Wilson, S., and Livi, G.P. (2000). A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* 275, 10767-10771.
- Chan, J.Y., Han, X.L., and Kan, Y.W. (1993). Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11371-11375.
- Chan, K., Lu, R., Chang, J.C., and Kan, Y.W. (1996). NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13943-13948.
- Chen, G., Bower, K.A., Ma, C., Fang, S., Thiele, C.J., and Luo, J. (2004). Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J* 18, 1162-1164.
- Chen, J., Bai, H., Wang, C., and Kang, J. (2006). Trichostatin A improves the anticancer activity of low concentrations of curcumin in human leukemia cells. *Pharmazie* 61, 710-716.
- Chen, R.H., Ding, W.V., and McCormick, F. (2000). Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 275, 17894-17899.
- Cho, M.K., Kim, W.D., Ki, S.H., Hwang, J.I., Choi, S., Lee, C.H., and Kim, S.G. (2007). Role of Galpha12 and Galpha13 as novel switches for the activity of Nrf2, a key antioxidative transcription factor. *Mol Cell Biol* 27, 6195-6208.
- Choi, R.C., Simon, J., Tsim, K.W., and Barnard, E.A. (2008). Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: relationship to internalization and scaffolding. *J Biol Chem* 283, 11050-11063.
- D'Ambrosi, N., Iafrate, M., Saba, E., Rosa, P., and Volonte, C. (2007). Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1592-1599.
- Davies, P., and Maloney, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
- De Vivo, M., Chen, J., Codina, J., and Iyengar, R. (1992). Enhanced phospholipase C stimulation and transformation in NIH-3T3 cells expressing Q209LGq-alpha-subunits. *J Biol Chem* 267, 18263-18266.
- Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F.C., Mistry, M., and Brown, D.A. (2002). Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron* 34, 209-220.

- Dhakshinamoorthy, S., and Jaiswal, A.K. (2000). Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem* 275, 40134-40141.
- Ding, Q., He, X., Hsu, J.M., Xia, W., Chen, C.T., Li, L.Y., Lee, D.F., Liu, J.C., Zhong, Q., Wang, X., and Hung, M.C. (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol* 27, 4006-4017.
- Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C.D., Zakhary, R., Hester, L.D., Guastella, D., and Snyder, S.H. (1999). Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2445-2450.
- Dranoff, J.A., O'Neill, A.F., Franco, A.M., Cai, S.Y., Connolly, G.C., Ballatori, N., Boyer, J.L., and Nathanson, M.H. (2000). A primitive ATP receptor from the little skate *Raja erinacea*. *J Biol Chem* 275, 30701-30706.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62, 649-671.
- Egea, J., Rosa, A.O., Cuadrado, A., Garcia, A.G., and Lopez, M.G. (2007). Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J Neurochem* 102, 1842-1852.
- Embi, N., Rylatt, D.B., and Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107, 519-527.
- Engel, T., Goni-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J., and Hernandez, F. (2006). Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99, 1445-1455.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C.I., and Weisman, G.A. (2006). P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452, 552-562.
- Espada, S., Rojo, A.I., Salinas, M., and Cuadrado, A. (2009). The muscarinic M1 receptor activates Nrf2 through a signaling cascade that involves protein kinase C and inhibition of GSK-3beta: connecting neurotransmission with neuroprotection. *J Neurochem* 110, 1107-1119.
- Farrera, J.A., Jauma, A., Ribo, J.M., Peire, M.A., Parellada, P.P., Roques-Choua, S., Bienvenue, E., and Seta, P. (1994). The antioxidant role of bile pigments evaluated by chemical tests. *Bioorg Med Chem* 2, 181-185.
- Felder, C.C. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9, 619-625.
- Felder, C.C., Bymaster, F.P., Ward, J., and DeLapp, N. (2000). Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem* 43, 4333-4353.
- Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B., and Deshaies, R.J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91, 221-230.

- Ferrandon, S., Feinstein, T.N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J.T., Gardella, T.J., and Vilardaga, J.P. (2009). Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol* 5, 734-742.
- Fischer, W., and Krugel, U. (2007). P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem* 14, 2429-2455.
- Fisher, A., Brandeis, R., Bar-Ner, R.H., Kliger-Spatz, M., Natan, N., Sonogo, H., Marcovitch, I., and Pittel, Z. (2002a). AF150(S) and AF267B: M1 muscarinic agonists as innovative therapies for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 19, 145-153.
- Fisher, A., Brandeis, R., Haring, R., Bar-Ner, N., Kliger-Spatz, M., Natan, N., Sonogo, H., Marcovitch, I., and Pittel, Z. (2002b). Impact of muscarinic agonists for successful therapy of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, 189-202.
- Fisher, A., Michaelson, D.M., Brandeis, R., Haring, R., Chapman, S., and Pittel, Z. (2000). M1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents in Alzheimer's disease. Rationale and perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 920, 315-320.
- Fisher, A., Pittel, Z., Haring, R., Bar-Ner, N., Kliger-Spatz, M., Natan, N., Egozi, I., Sonogo, H., Marcovitch, I., and Brandeis, R. (2003). M1 muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy. *J Mol Neurosci* 20, 349-356.
- Floriano-Sanchez, E., Villanueva, C., Medina-Campos, O.N., Rocha, D., Sanchez-Gonzalez, D.J., Cardenas-Rodriguez, N., and Pedraza-Chaverri, J. (2006). Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 40, 523-533.
- Foresti, R., Goatly, H., Green, C.J., and Motterlini, R. (2001). Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H1976-1984.
- Forlenza, O.V., Spink, J.M., Dayanandan, R., Anderton, B.H., Olesen, O.F., and Lovestone, S. (2000). Muscarinic agonists reduce tau phosphorylation in non-neuronal cells via GSK-3beta inhibition and in neurons. *J Neural Transm* 107, 1201-1212.
- Franke, H., Krugel, U., and Illes, P. (2006). P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch* 452, 622-644.
- Fujita, T., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009). P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* 57, 244-257.
- Fumagalli, M., Trincavelli, L., Lecca, D., Martini, C., Ciana, P., and Abbracchio, M.P. (2004). Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor. *Biochem Pharmacol* 68, 113-124.

- Furchgott, R.F., and Jothianandan, D. (1991). Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28, 52-61.
- Furukawa, M., and Xiong, Y. (2005). BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol* 25, 162-171.
- Garrido, J.L., Godoy, J.A., Alvarez, A., Bronfman, M., and Inestrosa, N.C. (2002). Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *FASEB J* 16, 1982-1984.
- Gerasimovskaya, E.V., Tucker, D.A., Weiser-Evans, M., Wenzlau, J.M., Klemm, D.J., Banks, M., and Stenmark, K.R. (2005). Extracellular ATP-induced proliferation of adventitial fibroblasts requires phosphoinositide 3-kinase, Akt, mammalian target of rapamycin, and p70 S6 kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 280, 1838-1848.
- Goode, N., Hughes, K., Woodgett, J.R., and Parker, P.J. (1992). Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem* 267, 16878-16882.
- Gorman, D., Drewry, A., Huang, Y.L., and Sames, C. (2003). The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology* 187, 25-38.
- Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.
- Grimes, C.A., and Jope, R.S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65, 391-426.
- Gupta, Y.K., Briyal, S., and Sharma, M. (2009). Protective effect of curcumin against kainic acid induced seizures and oxidative stress in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 53, 39-46.
- Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (1992). Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med* 12, 93-95.
- Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A., and Yamada, M. (2009). Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* 175, 2557-2565.
- Hansberg W. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico* 2002; 26:19-54.
- Hardy, A.R., Jones, M.L., Mundell, S.J., and Poole, A.W. (2004). Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood* 104, 1745-1752.
- Hayakawa, M., Kitagawa, H., Miyazawa, K., Kitagawa, M., and Kikugawa, K. (2005). The FWD1/beta-TrCP-mediated degradation pathway establishes a 'turning off switch' of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1. *Genes Cells* 10, 241-251.
- Hayakawa, M., Matsushima, M., Hagiwara, H., Oshima, T., Fujino, T., Ando, K., Kikugawa, K., Tanaka, H., Miyazawa, K., and Kitagawa, M. (2008). Novel insights into FGD3, a putative

- GEF for Cdc42, that undergoes SCF(FWD1/beta-TrCP)-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes Cells* 13, 329-342.
- Hill-Kapturczak, N., Chang, S.H., and Agarwal, A. (2002). Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol* 21, 307-321.
- Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., and Conley, P.B. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409, 202-207.
- Huang, H.C., Nguyen, T., and Pickett, C.B. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12475-12480.
- Huang, H.C., Nguyen, T., and Pickett, C.B. (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277, 42769-42774.
- Huwiler, A., Rolz, W., Dorsch, S., Ren, S., and Pfeilschifter, J. (2002). Extracellular ATP and UTP activate the protein kinase B/Akt cascade via the P2Y(2) purinoceptor in renal mesangial cells. *Br J Pharmacol* 136, 520-529.
- Innamorato, N.G., Jazwa, A., Rojo, A.I., Garcia, C., Fernandez-Ruiz, J., Grochot-Przeczek, A., Stachurska, A., Jozkowicz, A., Dulak, J., and Cuadrado, A. Different susceptibility to the Parkinson's toxin MPTP in mice lacking the redox master regulator Nrf2 or its target gene heme oxygenase-1. *PLoS One* 5, e11838.
- Irino, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., Kohsaka, S., and Ohsawa, K. (2008). Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *J Neurosci Res* 86, 1511-1519.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76-86.
- Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L.O., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., Nauze, M., Champagne, E., Terce, F., Gachet, C., Perret, B., Collet, X., Boeynaems, J.M., and Barbaras, R. (2005). The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 62, 2508-2515.
- Jain, A.K., Bloom, D.A., and Jaiswal, A.K. (2005). Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* 280, 29158-29168.
- Jain, A.K., and Jaiswal, A.K. (2006). Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem* 281, 12132-12142.
- Jain, A.K., and Jaiswal, A.K. (2007). GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem* 282, 16502-16510.
- Jaiswal, A.K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36, 1199-1207.

- Janssens, R., Paindavoine, P., Parmentier, M., and Boeynaems, J.M. (1999). Human P2Y2 receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants. *Br J Pharmacol* 127, 709-716.
- Jazwa, A., and Cuadrado, A. Targeting Heme Oxygenase-1 for Neuroprotection and Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Curr Drug Targets*.
- Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E., and Izquierdo, I. (1997). Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res* 22, 507-515.
- Kang, T., Wei, Y., Honaker, Y., Yamaguchi, H., Appella, E., Hung, M.C., and Piwnica-Worms, H. (2008). GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* 13, 36-47.
- Kannan, R., Tang, D., Mackic, J.B., Zlokovic, B.V., and Fernandez-Checa, J.C. (1993). A simple technique to determine glutathione (GSH) levels and synthesis in ocular tissues as GSH-bimane adduct: application to normal and galactosemic guinea-pigs. *Exp Eye Res* 56, 45-50.
- Katsuoka, F., Motohashi, H., Ishii, T., Aburatani, H., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2005). Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Mol Cell Biol* 25, 8044-8051.
- Katz, A., Wu, D., and Simon, M.I. (1992). Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360, 686-689.
- Kaur, H., Hughes, M.N., Green, C.J., Naughton, P., Foresti, R., and Motterlini, R. (2003). Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett* 543, 113-119.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 89-116.
- Kim, H.P., Wang, X., Galbiati, F., Ryter, S.W., and Choi, A.M. (2004). Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 18, 1080-1089.
- Kirkby, K.A., and Adin, C.A. (2006). Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F563-571.
- Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsui, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24, 7130-7139.
- Kobayashi, A., Kang, M.I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2006a). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26, 221-229.
- Kobayashi, M., and Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 7, 385-394.
- Kobayashi, M., and Yamamoto, M. (2006b). Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46, 113-140.
- Koch, H.J., Haas, S., and Jurgens, T. (2005). On the physiological relevance of muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 12, 2915-2921.

- Königsberg Fainstein M. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26(1): 18-25.
- Krugel, U., Kittner, H., Franke, H., and Illes, P. (2001). Stimulation of P2 receptors in the ventral tegmental area enhances dopaminergic mechanisms in vivo. *Neuropharmacology* 40, 1084-1093.
- Kumar, P., Padi, S.S., Naidu, P.S., and Kumar, A. (2007). Possible neuroprotective mechanisms of curcumin in attenuating 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29, 19-25.
- Kumar, S., and Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157, 175-188.
- Lee, J.M., Calkins, M.J., Chan, K., Kan, Y.W., and Johnson, J.A. (2003a). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* 278, 12029-12038.
- Lee, J.M., and Johnson, J.A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37, 139-143.
- Lee, J.M., Shih, A.Y., Murphy, T.H., and Johnson, J.A. (2003b). NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 278, 37948-37956.
- Lee, J.S., and Surh, Y.J. (2005). Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* 224, 171-184.
- Lee, K.Y., Koh, S.H., Noh, M.Y., Park, K.W., Lee, Y.J., and Kim, S.H. (2007). Glycogen synthase kinase-3 β activity plays very important roles in determining the fate of oxidative stress-inflicted neuronal cells. *Brain Res* 1129, 89-99.
- Leffler, C.W., Parfenova, H., Jaggar, J.H., and Wang, R. (2006). Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol* 100, 1065-1076.
- Li, W., Jain, M.R., Chen, C., Yue, X., Hebbar, V., Zhou, R., and Kong, A.N. (2005). Nrf2 Possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. *J Biol Chem* 280, 28430-28438.
- Li, W., and Kong, A.N. (2009). Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 48, 91-104.
- Li, W., Yu, S.W., and Kong, A.N. (2006). Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J Biol Chem* 281, 27251-27263.
- Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y.H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T., Gauntitz, F., and Dennery, P.A. (2007). Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem* 282, 20621-20633.
- Lindenboim, L., Pinkas-Kramarski, R., Sokolovsky, M., and Stein, R. (1995). Activation of muscarinic receptors inhibits apoptosis in PC12M1 cells. *J Neurochem* 64, 2491-2499.

- Lo, S.C., and Hannink, M. (2006). PGAM5, a Bcl-XL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem* 281, 37893-37903.
- Lo, S.C., and Hannink, M. (2008). PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Res* 314, 1789-1803.
- Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R., and Avila, J. (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 20, 27-39.
- Maghzal, G.J., Leck, M.C., Collinson, E., Li, C., and Stocker, R. (2009). Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *J Biol Chem* 284, 29251-29259.
- Maines, M.D., Raju, V.S., and Panahian, N. (1999). Spin trap (N-t-butyl-alpha-phenylnitron)-mediated suprainduction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: role of the oxygenase in protection against oxidative injury. *J Pharmacol Exp Ther* 291, 911-919.
- Malaval, C., Laffargue, M., Barbaras, R., Rolland, C., Peres, C., Champagne, E., Perret, B., Terce, F., Collet, X., and Martinez, L.O. (2009). RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cell Signal* 21, 120-127.
- Mamedova, L.K., Gao, Z.G., and Jacobson, K.A. (2006). Regulation of death and survival in astrocytes by ADP activating P2Y1 and P2Y12 receptors. *Biochem Pharmacol* 72, 1031-1041.
- Mangelus, M., Kroyter, A., Galron, R., and Sokolovsky, M. (2001). Reactive oxygen species regulate signaling pathways induced by M1 muscarinic receptors in PC12M1 cells. *J Neurochem* 76, 1701-1711.
- Marais, R.M., Nguyen, O., Woodgett, J.R., and Parker, P.J. (1990). Studies on the primary sequence requirements for PKC-alpha, -beta 1 and -gamma peptide substrates. *FEBS Lett* 277, 151-155.
- Marchese, A., George, S.R., Kolakowski, L.F., Jr., Lynch, K.R., and O'Dowd, B.F. (1999). Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 20, 370-375.
- Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., and Mecocci, P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 827, 65-75.
- Marinissen, M.J., Tanos, T., Bolos, M., de Sagarra, M.R., Coso, O.A., and Cuadrado, A. (2006). Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 281, 11332-11346.
- Marteau, F., Communi, D., Boeynaems, J.M., and Suarez Gonzalez, N. (2004). Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 76, 796-803.
- Marteau, F., Le Poul, E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., Boeynaems, J.M., and Gonzalez, N.S. (2003). Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol Pharmacol* 64, 104-112.

- Martin, D., Rojo, A.I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., De Galarreta, C.M., and Cuadrado, A. (2004). Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 279, 8919-8929.
- Martin, M.J., Tanos, T., Garcia, A.B., Martin, D., Gutkind, J.S., Coso, O.A., and Marinissen, M.J. (2007). The Galpha12/13 family of heterotrimeric G proteins and the small GTPase RhoA link the Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor to heme oxygenase-1 expression and tumorigenesis. *J Biol Chem* 282, 34510-34524.
- McCoubrey, W.K., Jr., Huang, T.J., and Maines, M.D. (1997). Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem* 272, 12568-12574.
- McDonagh, A.F., and Assisi, F. (1972). The ready isomerization of bilirubin IX- in aqueous solution. *Biochem J* 129, 797-800.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* 279, 31556-31567.
- Michel, A.D., Stefanich, E., and Whiting, R.L. (1989). PC12 pheochromocytoma cells contain an atypical muscarinic receptor binding site. *Br J Pharmacol* 97, 914-920.
- Miyazaki, T., Kirino, Y., Takeno, M., Samukawa, S., Hama, M., Tanaka, M., Yamaji, S., Ueda, A., Tomita, N., Fujita, H., and Ishigatsubo, Y. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor Bach1. *Cancer Sci*.
- Moers, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Wettschureck, N., Gruner, S., Konrad, I., Schulte, V., Aktas, B., Gratacap, M.P., Simon, M.I., Gawaz, M., and Offermanns, S. (2003). G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nat Med* 9, 1418-1422.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9926-9930.
- Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2004). Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6379-6384.
- Motterlini, R., Clark, J.E., Foresti, R., Sarathchandra, P., Mann, B.E., and Green, C.J. (2002). Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* 90, E17-24.
- Muir, J.L. (1997). Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 56, 687-696.

- Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2004). The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 429, 566-571.
- Nakao, A., Otterbein, L.E., Overhaus, M., Sarady, J.K., Tsung, A., Kimizuka, K., Nalesnik, M.A., Kaizu, T., Uchiyama, T., Liu, F., Murase, N., Bauer, A.J., and Bach, F.H. (2004). Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* 127, 595-606.
- Nath, K.A., Balla, G., Vercellotti, G.M., Balla, J., Jacob, H.S., Levitt, M.D., and Rosenberg, M.E. (1992). Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90, 267-270.
- Neary, J.T., and Kang, Y. (2006a). P2 purinergic receptors signal to glycogen synthase kinase-3beta in astrocytes. *J Neurosci Res* 84, 515-524.
- Neary, J.T., Kang, Y., Shi, Y.F., Tran, M.D., and Wanner, I.B. (2006b). P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions. *Novartis Found Symp* 276, 131-143; discussion 143-137, 233-137, 275-181.
- Neves, S.R., Ram, P.T., and Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science* 296, 1636-1639.
- Nicholas, R.A., Lazarowski, E.R., Watt, W.C., Li, Q., Boyer, J., and Harden, T.K. (1996). Pharmacological and second messenger signalling selectivities of cloned P2Y receptors. *J Auton Pharmacol* 16, 319-323.
- Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2003). Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* 374, 337-348.
- Nioi, P., and Nguyen, T. (2007). A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 816-821.
- Numazawa, S., Ishikawa, M., Yoshida, A., Tanaka, S., and Yoshida, T. (2003). Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C334-342.
- O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Bouvier, M. (1989). Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* 264, 7564-7569.
- Oddo, S., Caccamo, A., Green, K.N., Liang, K., Tran, L., Chen, Y., Leslie, F.M., and LaFerla, F.M. (2005). Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3046-3051.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421.

- Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., and Igarashi, K. (2001). Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* 20, 2835-2843.
- Ogborne, R.M., Rushworth, S.A., and O'Connell, M.A. (2008). Epigallocatechin activates haem oxygenase-1 expression via protein kinase Cdelta and Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 584-588.
- Ohara, K., Uchiyama, H., Ohara, K., Haga, T., and Ichiyama, A. (1990). Interaction of deglycosylated muscarinic receptors with ligands and G proteins. *Eur J Pharmacol* 189, 341-346.
- Ortega, F., Perez-Sen, R., and Miras-Portugal, M.T. (2008). Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons. *J Neurochem* 104, 62-73.
- Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A., and Choi, A.M. (2000a). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6, 422-428.
- Otterbein, L.E., and Choi, A.M. (2000b). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1029-1037.
- Padmanabhan, B., Scharlock, M., Tong, K.I., Nakamura, Y., Kang, M.I., Kobayashi, A., Matsumoto, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., and Yokoyama, S. (2005). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the Kelch-like motif region of mouse Keap1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 61, 153-155.
- Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L., and Wang, B. (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* 26, 3365-3377.
- Papaiahgari, S., Kleeberger, S.R., Cho, H.Y., Kalvakolanu, D.V., and Reddy, S.P. (2004). NADPH oxidase and ERK signaling regulates hyperoxia-induced Nrf2-ARE transcriptional response in pulmonary epithelial cells. *J Biol Chem* 279, 42302-42312.
- Papkoff, J., and Aikawa, M. (1998). WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 851-858.
- Pi, J., Bai, Y., Reece, J.M., Williams, J., Liu, D., Freeman, M.L., Fahl, W.E., Shugar, D., Liu, J., Qu, W., Collins, S., and Waalkes, M.P. (2007). Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med* 42, 1797-1806.
- Piantadosi, C.A., Tatro, L., and Zhang, J. (1995). Hydroxyl radical production in the brain after CO hypoxia in rats. *Free Radic Biol Med* 18, 603-609.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.

- Pinkas-Kramarski, R., Stein, R., Lindenboim, L., and Sokolovsky, M. (1992). Growth factor-like effects mediated by muscarinic receptors in PC12M1 cells. *J Neurochem* 59, 2158-2166.
- Poss, K.D., and Tonegawa, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10925-10930.
- Rajeswari, A., and Sabesan, M. (2008). Inhibition of monoamine oxidase-B by the polyphenolic compound, curcumin and its metabolite tetrahydrocurcumin, in a model of Parkinson's disease induced by MPTP neurodegeneration in mice. *Inflammopharmacology* 16, 96-99.
- Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-492.
- Rojo, A.I., Rada, P., Egea, J., Rosa, A.O., Lopez, M.G., and Cuadrado, A. (2008a). Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Mol Cell Neurosci* 39, 125-132.
- Rojo, A.I., Sagarra, M.R., and Cuadrado, A. (2008b). GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* 105, 192-202.
- Rossi, M.A., Mash, D.C., and deToledo-Morrell, L. (2005). Spatial memory in aged rats is related to PKCgamma-dependent G-protein coupling of the M1 receptor. *Neurobiol Aging* 26, 53-68.
- Rushworth, S.A., Ogborne, R.M., Charalambos, C.A., and O'Connell, M.A. (2006). Role of protein kinase C delta in curcumin-induced antioxidant response element-mediated gene expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 1007-1016.
- Ryter, S.W., and Choi, A.M. (2005). Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signal* 7, 80-91.
- Ryter, S.W., and Otterbein, L.E. (2004). Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 26, 270-280.
- Ryter, S.W., Otterbein, L.E., Morse, D., and Choi, A.M. (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235, 249-263.
- Sak, K., and Webb, T.E. (2002). A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch Biochem Biophys* 397, 131-136.
- Salazar, M., Rojo, A.I., Velasco, D., de Sagarra, R.M., and Cuadrado, A. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 281, 14841-14851.
- Salinas, M., Diaz, R., Abraham, N.G., Ruiz de Galarreta, C.M., and Cuadrado, A. (2003). Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 278, 13898-13904.

- Sankaranarayanan, K., and Jaiswal, A.K. (2004). Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem* 279, 50810-50817.
- Savarese, T.M., Wang, C.D., and Fraser, C.M. (1992). Site-directed mutagenesis of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor. Role of conserved cysteines in receptor function. *J Biol Chem* 267, 11439-11448.
- Schuller, D.J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P., and Poulos, T.L. (1998). Crystallization of recombinant human heme oxygenase-1. *Protein Sci* 7, 1836-1838.
- Sedlak, T.W., and Snyder, S.H. (2004). Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics* 113, 1776-1782.
- Sedlak, T.W., and Snyder, S.H. (2006). Messenger molecules and cell death: therapeutic implications. *JAMA* 295, 81-89.
- Seo, J.S., Leem, Y.H., Lee, K.W., Kim, S.W., Lee, J.K., and Han, P.L. Severe Motor Neuron Degeneration in the Spinal Cord of the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Alzheimers Dis*.
- Shibahara, S., Yoshida, T., and Kikuchi, G. (1980). Intracellular site of synthesis of microsomal heme oxygenase in pig spleen. *J Biochem* 88, 45-50.
- Shin, S.Y., Yoon, S.C., Kim, Y.H., Kim, Y.S., and Lee, Y.H. (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β at serine-9 by phospholipase C γ 1 through protein kinase C in rat 3Y1 fibroblasts. *Exp Mol Med* 34, 444-450.
- Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ishida, S., Sawada, J., Ohno, Y., and Inoue, K. (2005). Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. *Glia* 49, 288-300.
- Shishodia, S., Sethi, G., and Aggarwal, B.B. (2005). Curcumin: getting back to the roots. *Ann N Y Acad Sci* 1056, 206-217.
- Simon, D., Benitez, M.J., Gimenez-Cassina, A., Garrido, J.J., Bhat, R.V., Diaz-Nido, J., and Wandosell, F. (2008). Pharmacological inhibition of GSK-3 is not strictly correlated with a decrease in tyrosine phosphorylation of residues 216/279. *J Neurosci Res* 86, 668-674.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-219.
- Slebos, D.J., Ryter, S.W., van der Toorn, M., Liu, F., Guo, F., Baty, C.J., Karlsson, J.M., Watkins, S.C., Kim, H.P., Wang, X., Lee, J.S., Postma, D.S., Kauffman, H.F., and Choi, A.M. (2007). Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 409-417.
- Stocker, R. (2004). Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 6, 841-849.
- Stocker, R., and Peterhans, E. (1989). Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin: biologically relevant scavenging of hypochlorous acid. *Free Radic Res Commun* 6, 57-66.

- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., and Ames, B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043-1046.
- Stone, J.R., and Marletta, M.A. (1994). Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33, 5636-5640.
- Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M.M., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2002). Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 21, 5216-5224.
- Sun, Z., Huang, Z., and Zhang, D.D. (2009). Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One* 4, e6588.
- Suzuki, H., Tashiro, S., Sun, J., Doi, H., Satomi, S., and Igarashi, K. (2003). Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 278, 49246-49253.
- Syktiotis, G.P., and Bohmann, D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* 3, re3.
- Takeda, A., Onodera, H., Sugimoto, A., Itoyama, Y., Kogure, K., and Shibahara, S. (1994). Increased expression of heme oxygenase mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 666, 120-124.
- Tang, F.R., Lee, W.L., Gao, H., Chen, Y., Loh, Y.T., and Chia, S.C. (2004). Expression of different isoforms of protein kinase C in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus with special reference to CA1 area and the dentate gyrus. *Hippocampus* 14, 87-98.
- Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1969). The enzymatic conversion of hemoglobin to bilirubin. *Trans Assoc Am Physicians* 82, 363-371.
- Theodore, M., Kawai, Y., Yang, J., Kleshchenko, Y., Reddy, S.P., Villalta, F., and Arinze, I.J. (2008). Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 283, 8984-8994.
- Thom, S.R. (1990). Carbon monoxide-mediated brain lipid peroxidation in the rat. *J Appl Physiol* 68, 997-1003.
- Toda, N., Takahashi, T., Mizobuchi, S., Fujii, H., Nakahira, K., Takahashi, S., Yamashita, M., Morita, K., Hirakawa, M., and Akagi, R. (2002). Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 30, 1512-1522.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F., and Yamamoto, M. (2006). Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* 387, 1311-1320.
- Torres, B., Zambon, A.C., and Insel, P.A. (2002). P2Y11 receptors activate adenylyl cyclase and contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D(1) cells. A mechanism for nucleotide-mediated autocrine-paracrine regulation. *J Biol Chem* 277, 7761-7765.

- Tu, M.T., Luo, S.F., Wang, C.C., Chien, C.S., Chiu, C.T., Lin, C.C., and Yang, C.M. (2000). P2Y₂ receptor-mediated proliferation of C(6) glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol* 129, 1481-1489.
- Utz, J., and Ullrich, V. (1991). Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 41, 1195-1201.
- Van Kolen, K., Gilany, K., Moens, L., Esmans, E.L., and Slegers, H. (2006a). P2Y₁₂ receptor signalling towards PKB proceeds through IGF-I receptor cross-talk and requires activation of Src, Pyk2 and Rap1. *Cell Signal* 18, 1169-1181.
- Van Kolen, K., and Slegers, H. (2004). P2Y₁₂ receptor stimulation inhibits beta-adrenergic receptor-induced differentiation by reversing the cyclic AMP-dependent inhibition of protein kinase B. *J Neurochem* 89, 442-453.
- Van Kolen, K., and Slegers, H. (2006b). Atypical PKC ζ is involved in RhoA-dependent mitogenic signaling by the P2Y₁₂ receptor in C6 cells. *FEBS J* 273, 1843-1854.
- van Koppen, C.J., and Nathanson, N.M. (1990). Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J Biol Chem* 265, 20887-20892.
- van Koppen, C.J., and Nathanson, N.M. (1991). The cysteine residue in the carboxyl-terminal domain of the m2 muscarinic acetylcholine receptor is not required for receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase. *J Neurochem* 57, 1873-1877.
- Venugopal, R., and Jaiswal, A.K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14960-14965.
- Vitolo, O.V., Ciotti, M.T., Galli, C., Borsello, T., and Calissano, P. (1998). Adenosine and ADP prevent apoptosis in cultured rat cerebellar granule cells. *Brain Res* 809, 297-301.
- Volonte, C., Amadio, S., Cavaliere, F., D'Ambrosi, N., Vacca, F., and Bernardi, G. (2003). Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2, 403-412.
- Volonte, C., Amadio, S., D'Ambrosi, N., Colpi, M., and Burnstock, G. (2006). P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther* 112, 264-280.
- von Kugelgen, I., and Wetter, A. (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 310-323.
- Wagner, J.R., Motchnik, P.A., Stocker, R., Sies, H., and Ames, B.N. (1993). The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J Biol Chem* 268, 18502-18506.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W., and Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2040-2045.

- Wang, B., and Li, Y. (2006). Evidence for the direct involvement of {beta}TrCP in Gli3 protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 33-38.
- Wang, M.S., Boddapati, S., Emadi, S., and Sierks, M.R. Curcumin reduces alpha-synuclein induced cytotoxicity in Parkinson's disease cell model. *BMC Neurosci* 11, 57.
- Wang, R., Wu, L., and Wang, Z. (1997). The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 434, 285-291.
- Waring, W.S., Convery, A., Mishra, V., Shenkin, A., Webb, D.J., and Maxwell, S.R. (2003). Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci (Lond)* 105, 425-430.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.
- Woodgett, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9, 2431-2438.
- Worzfeld, T., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2008). G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends Pharmacol Sci* 29, 582-589.
- Xiong, Y., Zhou, Y., and Jarrett, H.W. (2009). Dystrophin glycoprotein complex-associated Gbetagamma subunits activate phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling in skeletal muscle in a laminin-dependent manner. *J Cell Physiol* 219, 402-414.
- Xu, C., Yuan, X., Pan, Z., Shen, G., Kim, J.H., Yu, S., Khor, T.O., Li, W., Ma, J., and Kong, A.N. (2006). Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol Cancer Ther* 5, 1918-1926.
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., and Koizumi, S. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103, 129-135.
- Yadav, R.S., Shukla, R.K., Sankhwar, M.L., Patel, D.K., Ansari, R.W., Pant, A.B., Islam, F., and Khanna, V.K. Neuroprotective effect of curcumin in arsenic-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology*.
- Yam-Canul, P., Chirino, Y.I., Sanchez-Gonzalez, D.J., Martinez-Martinez, C.M., Cruz, C., Villanueva, C., and Pedraza-Chaverri, J. (2008). Nordihydroguaiaretic acid attenuates potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol* 46, 1089-1096.
- Yang, C., Zhang, X., Fan, H., and Liu, Y. (2009). Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res* 1282, 133-141.
- Youdim, M.B., and Buccafusco, J.J. (2005). CNS Targets for multi-functional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neural Transm* 112, 519-537.
- Yuan, X., Xu, C., Pan, Z., Keum, Y.S., Kim, J.H., Shen, G., Yu, S., Oo, K.T., Ma, J., and Kong, A.N. (2006). Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Mol Carcinog* 45, 841-850.

- Zhang, D.D. (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 38, 769-789.
- Zhang, D.D., and Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23, 8137-8151.
- Zhang, D.D., Lo, S.C., Cross, J.V., Templeton, D.J., and Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* 24, 10941-10953.
- Zhang, H., and Forman, H.J. (2008). Acrolein induces heme oxygenase-1 through PKC-delta and PI3K in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 483-490.
- Zhang, J., and Piantadosi, C.A. (1992). Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. *J Clin Invest* 90, 1193-1199.
- Zhang, Y.X., Yamashita, H., Ohshita, T., Sawamoto, N., and Nakamura, S. (1995). ATP increases extracellular dopamine level through stimulation of P2Y purinoceptors in the rat striatum. *Brain Res* 691, 205-212.
- Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6, 931-940.
- Zhu, Z., and Kirschner, M. (2002). Regulated proteolysis of Xom mediates dorsoventral pattern formation during early *Xenopus* development. *Dev Cell* 3, 557-568.

ANEXOS